

ANDREZZA BEATRIZ OLIVEIRA

**MICROENCAPSULAMENTO DE ESTIGMASTEROL PROVENIENTE DE *Musa
paradisiaca* L., MUSACEAE**

CURITIBA
2007

ANDREZZA BEATRIZ OLIVEIRA

MICROENCAPSULAMENTO DE ESTIGMASTEROL PROVENIENTE DE *Musa paradisiaca* L., MUSACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof. Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA
2007

TERMO DE APROVAÇÃO

Andrezza Beatriz de Oliveira

Título: Microencapsulamento de estigmasterol
proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae

Dissertação aprovada como requisito parcial para a
obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal do Paraná, área de concentração Insumos,
medicamentos e correlatos.

Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Orientadora

Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. Iara Maria Pereira Machado
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 29 de março de 2007.

Dedico este trabalho a Deus, à
minha família e amigos pela
paciência e apoio, aos docentes
pela colaboração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo oferecimento dos elementos necessários em todos os momentos para possibilitar a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

Aos professores e colegas do Programa de Pós Graduação, sobretudo pela colaboração e estímulo nos diversos momentos desta caminhada.

À Dra. Sandra M. W. Zanin, por tudo o que representou desde o início.

Aos orientadores Dra. Marilis Dallarmi Miguel e Dr. Obdulio Gomes Miguel, pelo tutoramento.

Ao Botânico Dr. Gert Hatschback, pela identificação da espécie vegetal.

À Dra. Mayumi Elisa O. Sato, pela disposição, estímulo e auxílio na busca de informações.

À Dra. Almeriane Welfort Santos e à Dra. Letícia Norma Carpentieri Rodrigues, pela atenção, conselhos e colaboração.

Ao Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela colaboração e gentil doação de padrão de estigmasterol utilizado no trabalho.

Ao Dr. Herbert A. Trebien, e à Dra. Jocelia Lago Jansen, pela paciência, apoio e disposição durante o ensaio de permeação cutânea.

Ao Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelo amparo durante a análise cromatográfica para o doseamento de estigmasterol.

A As Ervas Curam Indústria Farmacêutica, pela disponibilização da infra-estrutura necessária para o ensaio de estabilidade acelerada.

A Regina Montrezol pela dedicação, atenção, carinho, alegria e estímulo durante todo o período da pós-graduação.

Aos amigos Janaina Packer, Paulo Vitor Farago, Shirley Boller e Haiét Zaki, pelo auxílio técnico e companheirismo.

A Thiago Alexandre da Silva, por oferecer além de apoio técnico, a sua valiosa e sincera amizade.

Aos amigos, pela paciência e, sobretudo, pelo auxílio e descontração, e pela importância que representaram para mim.

Aos meus pais e irmã, pelo companheirismo, apoio, dedicação, compreensão, e amor.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigada.

“A melhor maneira de encontrar as respostas que buscamos é ter o tempo para ouvi-las”
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	vi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVO GERAL	04
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	04
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 <i>Musa paradisiaca</i> L., MUSACEAE	05
2.2 OS FITOESTERÓIDES	11
2.2.1 Ação Hipocolesterolêmica	17
2.2.2 Ação Anticancerígena	17
2.2.2.1 Efeito sobre a estrutura de membranas celulares.....	19
2.2.2.2 Efeito sobre a fluidez de membranas celulares	19
2.2.2.3 Efeito sobre enzimas ligadas à membrana	20
2.2.2.4 Efeito sobre as vias de transdução de sinal	21
2.2.2.5 Efeito sobre a apoptose	21
2.2.2.6 Efeito sobre a integridade da membrana	22
2.2.2.7 Efeito sobre a função imunológica	22
2.2.2.8 Efeito sobre propriedades esterogênicas nos tecidos	22
2.2.2.9 Efeito sobre esteróides ácidos e neutros no cólon	23
2.3 O ESTIGMASTEROL	24
2.4 MICROENCAPSULAMENTO	27
2.4.1 Funções do Microencapsulamento	28
2.4.2 Materiais de Revestimento e Metodologias de Preparo de Micropartículas	29
2.4.3 Caracterização de Micropartículas	32
2.5 A ABSORÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FRENTE AO MICROENCAPSULAMENTO	33
2.6 A ESTABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS FRENTE AO MICROENCAPSULAMENTO ..	37
3 METODOLOGIA	38
3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL	38
3.2 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL	38
3.2.1 Determinação de Umidade	38

3.2.2 Determinação de Cinzas Totais	39
3.2.3 Estudo Fitoquímico	39
3.2.3.1 Extrato etanólico	39
3.2.3.1.1 Pesquisa de alcalóides	40
3.2.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas	41
3.2.3.1.3 Pesquisa de flavonóides	41
3.2.3.1.3.1 Reação de Taubock ou teste do oxálico-bórico	42
3.2.3.1.4 Pesquisa de cumarinas	42
3.2.3.1.5 Pesquisa de antraquinonas	43
3.2.3.1.6 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos	44
3.2.3.2 Extrato aquoso	44
3.2.3.2.1 Pesquisa de antocianinas	44
3.2.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	45
3.2.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	45
3.2.3.2.4 Pesquisa de taninos	46
3.2.3.2.4.1 Cloreto férrico	46
3.2.3.2.4.2 Solução de gelatina	46
3.2.3.2.4.3 Cloridrato de emetina	46
3.2.3.2.4.4 Formol clorídrico ou ensaio de Staniasny	46
3.2.3.2.5 Pesquisa de aminogrupos	47
3.2.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos	47
3.2.3.2.7 Pesquisa de ácidos voláteis	48
3.3 EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL A PARTIR DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA .	49
3.3.1. Cromatografia em Coluna	49
3.3.2 Cromatografia em Camada Delgada	50
3.3.3. Cristalização do Estigmasterol a Partir do Eluato da Coluna Cromatográfica	50
3.3.4. Confirmação da Pureza da Substância Extraída	51
3.3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	51
3.3.4.2 Cromatografia gasosa	52
3.3.4.3 Espectrometria sob radiação infravermelha	52
3.4 MICROENCAPSULAMENTO DO ESTIGMASTEROL	53
3.4.1 Produção de Micropartículas com Revestimento de Gelatina	53
3.4.2 Produção de Micropartículas com Revestimento de Ácido Esteárico	54
3.5 AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	55
3.5.1 Rendimento da Produção	55
3.5.2 Doseamento de Estigmasterol Contido nas Micropartículas	55

3.5.3 Tamanho e Morfologia das Micropartículas	56
3.5.4 Avaliação de Absortividade e Permeação em Tecido Cutâneo	56
3.5.4.1 Coeficiente de partição óleo-água	57
3.5.4.2 Perfil de dissolução	58
3.5.4.3 Ensaio de permeação cutânea	61
3.5.5 Avaliação da Estabilidade do Estigmasterol Microencapsulado	62
3.5.6 Redação do Documento Científico	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA	64
4.2 EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL A PARTIR DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA	66
4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	69
4.2.2 Cromatografia Gasosa	75
4.2.3 Espectrometria Sob Radiação Infravermelha	76
4.3 MICROENCAPSULAMENTO DO ESTIGMASTEROL	78
4.3.1 Tamanho e Morfologia das Micropartículas	80
4.3.2 Concentração de Estigmasterol Contido nas Micropartículas	83
4.3.3 Avaliação de Absortividade e Permeação em Tecido Cutâneo	86
4.3.3.1 Coeficiente de partição óleo-água.....	86
4.3.3.2 Perfil de dissolução.....	88
4.3.3.3 Ensaio de permeação cutânea	92
4.3.4 Avaliação da Estabilidade do Estigmasterol Microencapsulado	95
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – IMAGENS DE <i>Musa paradisiaca</i> L., MUSACEAE	05
FIGURA 2 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DE SUBSTÂNCIAS ESTEROIDAIS	12
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA DE REAÇÕES PARA A FORMAÇÃO DE ISOPRENO	13
FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DE ESQUALENO A PARTIR DE CONDENSAÇÕES SUCESSIVAS DE UNIDADES DE ISOPRENO	14
FIGURA 5 - O SISTEMA DE ANÉIS BÁSICO DOS ESTERÓIDES E AS CONFORMAÇÕES 5 α E 5 β	15
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MICROENCAPSULAMENTO POR COACERVAÇÃO	32
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE ABSORÇÃO INTESTINAL DE NANOPARTÍCULAS	34
FIGURA 8 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA NA EXTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL	68
FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DA PLACA CROMATOGRÁFICA EM CAMADA DELGADA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL .	68
FIGURA 10 – INTENSIDADE DE ABSORTIVIDADE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PELOS SINAIS PROVENIENTES DO SOLVENTE E DO ESTIGMASTEROL ...	70
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DO CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSA OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA	75
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DO ESPECTRO FT-IR DO ESTIGMASTEROL	76
FIGURA 13 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE CRISTAIS DE ESTIGMASTEROL	80
FIGURA 14 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE GELATINA.....	80
FIGURA 15 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM REVESTIMENTO DE GELATINA	80
FIGURA 16 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE ÁCIDO ESTEÁRICO	81
FIGURA 17 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM REVESTIMENTO DE ÁCIDO ESTEÁRICO	81
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM CLAE PARA MICROPARTÍCULAS DE REVESTIMENTO PROTÉICO	83

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM CLAE PARA MICROPARTÍCULAS DE REVESTIMENTO LIPÍDICO	84
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DURANTE O ENSAIO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ESTIGMASTEROL	97

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DA VARREDURA DE COMPRIMENTOS DE ONDA DO ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL ABSORVIDOS POR ESTIGMASTEROL	71
GRÁFICO 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O DOSEAMENTO DE ESTIGMASTEROL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	73
GRÁFICO 3 – CROMATOGRAMA DE ESTIGMASTEROL A 0,35mg/mL EM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	74
GRÁFICO 4 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DO ESTIGMASTEROL E MICROPARTÍCULAS	89
GRÁFICO 5 – PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO ESTIGMASTEROL CONTIDO NAS AMOSTRAS.....	92
GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL DURANTE O ENSAIO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA	96
GRÁFICO 7 – PERFIL DE FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ESTIGMASTEROL	96
GRÁFICO 8 – RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Musa paradisiaca</i> L. SEGUNDO CRONQUIST E ENGLER	07
QUADRO 2 – VALOR NUTRICIONAL DA BANANA	09
QUADRO 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS FITOESTERÓIDES	11
QUADRO 4 - NOMENCLATURA BÁSICA DOS ESTERÓIDES	16
QUADRO 5 – ESTRUTURA QUÍMICA NUMERADA DO ESTIGMASTEROL	24
QUADRO 6 - FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO DE GRUPAMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NA ESTRUTURA DO ESTIGMASTEROL	77
TABELA 1 – DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS EM <i>Musa paradisiaca</i>	64
TABELA 2 – DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES EM <i>Musa paradisiaca</i>	65
TABELA 3– RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL	66
TABELA 4– ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A EXTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL	67
TABELA 5 – VALORES DE $\lambda_{MÁX}$ OBSERVADAS PARA OS SINAIS OBTIDOS NA ELUIÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE ESTIGMASTEROL	71
TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A VALIDAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	72
TABELA 7–CÁLCULO DO RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS .	78
TABELA 8 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS	79
TABELA 9 – DOSEAMENTO DE ESTIGMASTEROL CONTIDO NAS MICROPARTÍCULAS	85
TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO-ÁGUA.....	86
TABELA 11– CLASSIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL DENTRO DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	87
TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE DE DISSOLUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	88
TABELA 13 – RESULTADOS CALCULADOS DE ESTUDO DE CINÉTICA, ED E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS	

DE ESTIGMASTEROL.....	90
TABELA 14 – CÁLCULO DE FATOR DE DIFERENÇA (f1) E FATOR DE SIMILARIDADE (f2) ENTRE OS PERFIS DE DISSOLUÇÃO	91
TABELA 15 – DADOS OBTIDOS PELO ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	93
TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS POR ESTUDO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA .	95
TABELA 17 – RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS AMOSTRAS SEGUNDO LEGISLAÇÃO VIGENTE.....	99
TABELA 18 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA	100

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

mg	miligramas
g	gramas
kg	quilogramas
t	toneladas
kcal	quilocalorias
m	metros
cm	centímetros
mm	milímetros
µm	micrômetros
nm	nanômetros
cm⁻¹	inverso de centímetro
cm²	centímetros quadrados
µL	microlitros
mL	mililitros
L	litros
mol/L	moles por litro
mmol/L	milimoles por litro
µmol/L	micromoles por litro
mmol	milimoles
N	normal, equivalentes por litro
h	horas
min	minutos
mbar	milibar
mA	miliampéres
kV	quilovolts
mV	milivolts
mAbs	miliabsorvância
rpm	rotações por minuto
scans/min	varreduras por minuto
ASTM	padrão de unidades <i>American Society for Testing and Materials</i>
n	número haplóide de cromossomos
v/v	volume por volume
L.	Linnaeus
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

RE	Resolução da Diretoria
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
MEV	microscopia eletrônica de varredura
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
CCD	cromatografia em camada delgada
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CG-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GC-MS	<i>gas chromatography with mass spectrometry</i>
FTIR	<i>Fourier transformer infrared spectrometry</i>
FT-IR	<i>Fourier transformer infrared spectrometry</i>
IVFT	espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier
UV	ultravioleta
vis	visível
Rf	fator de relação
RP	fase reversa
GL	graus de liberdade do teste t de student
n	número de amostras
DPR	desvio padrão relativo
R²	coeficiente de relação de Pearson
f1	fator de diferença
f2	fator de similaridade
C	concentração
Conc	concentração
Micropart.	micropartículas
Estigmast.	estigmasterol
t	tempo
o/a	óleo e água
Po/a	partição em óleo e água
Kp	coeficiente de permeabilidade
L	espessura de difusão
D : S	relação entre dose e solubilidade
K	constante de velocidade de dissolução
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
Na⁺	cátion sódio
K⁺	cátion potássio

C	carbono
H	hidrogênio
O	oxigênio
C-(número)	número do átomo de carbono na estrutura química
C-H	ligação química entre carbono e hidrogênio
NaOH	hidróxido de sódio
CoA	coenzima A
NADH	forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo
ferro (III)	átomo de ferro com valência +3
ATPase	enzima clivadora de adenosina trifosfato
PKC	proteína quinase C
PP2A	proteína fosfatase 2A
HMG	hidroximetilglutaril
LDL	lipoproteína de baixa densidade
HDL	lipoproteína de alta densidade
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
SLN	nanopartículas de lipídeos sólidos
NLC	carreadores lipídicos nanoestruturados
LDC	conjugado fármaco-lipídeo
TGF-β	fator de crescimento de transformação beta
G1	fase de crescimento do ciclo celular
DNA	ácido desoxirribonucléico
HT-29	denominação de cultura celular de câncer de cólon
LNCaP	denominação de cultura celular de câncer de próstata
MDA-MB-231	denominação de cultura celular de câncer de mama
MCF-7	denominação de cultura celular de câncer de mama
p53	denominação de oncogene envolvido no mecanismo de câncer
p16	denominação de oncogene envolvido no mecanismo de câncer
<i>prad</i>	denominação de oncogene envolvido no mecanismo de câncer
<i>blc-2</i>	denominação de gene envolvido no mecanismo de câncer
MNNG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, mutagene envolvido no mecanismo de câncer
4-NQO	4-nitroquinolina-N-óxido, mutagene envolvido no mecanismo de câncer
p-PEG 4000	palmitoil-poli(etilenoglicol) de peso molecular 4000 Dalton
PLGA-PEG	poli[lactideo-co-glicolideo]-poli(etilenoglicol)
PLA-PEG	poli[L-lactideo]-poli(etilenoglicol)
PLA-PEG-PLA	poli[L-lactideo]-poli(etilenoglicol)- poli[L-lactideo]
α	alfa

β	beta
λ	lambda
Δ	delta
α	nível de risco do teste t de student
λ	comprimento de onda
$\Delta(\text{número})$	dupla ligação no átomo de carbono com o(s) respectivo(s) número(s)
/	por
x	vezes
<	menor
°C	graus Celsius
°	graus
'	minutos
''	segundos
S	sul
Wg	<i>West Greenwich</i>
\pm	variação máxima e mínima
$[\alpha]_D^{25}$	desvio rotatório a 25 graus Celsius
ED ₅₀	concentração de um fármaco necessária para promover 50% do máximo efeito possível
t _{50%}	tempo em que metade do fármaco é liberado
1:1	uma parte para uma parte
1:10	uma parte para dez partes
93:7	Noventa e três partes para sete partes
30:70	trinta partes para setenta partes
logP	coeficiente de partição óleo-água
L _D	limite de detecção
L _Q	limite de quantificação
Q α	quantidade total de fármaco
Q	quantidade de fármaco dissolvida
%ND	porcentagem não dissolvida do fármaco
%D	porcentagem dissolvida do fármaco
\sqrt{t}	raiz quadrada do tempo
ED	eficiência de dissolução
NG-SF	micropartículas com revestimento de gelatina sem fármaco
NG-E	micropartículas com revestimento de gelatina com estigmasterol
SLN-SF	micropartículas com revestimento de ácido esteárico sem fármaco
SLN-E	micropartículas com revestimento de ácido esteárico com estigmasterol

RESUMO

O estigmasterol é uma substância esteroidal de origem vegetal, presente na maioria das espécies, com propriedades farmacológicas hipocolesterolêmica, antiinflamatória, antinociceptiva e preventiva de cânceres mamário e prostático ainda pouco exploradas. Apresenta estrutura química susceptível a oxidação, além de absorção reduzida pelo organismo. Nesse contexto, o seu microencapsulamento é conveniente pois busca reduzir a sua degradação e aumentar a sua absorvidade. A extração fitoquímica do estigmasterol foi realizada a partir de 10,43kg de cascas secas e estabilizadas de frutos maduros de *Musa paradisiaca* L., Musaceae, utilizando etanol e em seguida hexano. O extrato hexânico foi submetido a tratamento de partição sólido-líquido com sílica gel G em soxhlet modificado com a sequência de solventes hexano, diclorometano e clorofórmio; seguido de cristalizações com éter de petróleo, acetona e n-pentanol para obter o estigmasterol em grau de pureza de 90,1% com rendimento de 0,05% em relação à massa de vegetal seco. O processo de extração e cristalização foi controlado por meio de CCD e CLAE, o grau de pureza foi determinado por CG-MS e a identidade da substância purificada confirmada como estigmasterol por FTIR. Foram então produzidas micropartículas do fármaco com componentes de revestimento de naturezas diferenciadas com o intuito de comparar os resultados de absorção e de estabilidade promovidas. Para o revestimento de natureza protéica, utilizou-se gelatina e método de coacervação simples, e para o revestimento de natureza lipídica, ácido esteárico e os tensoativos fosfatidilcolina de soja e monooleato de sorbitano etoxilado por método de polimerização de microemulsão. As micropartículas formadas foram avaliadas quanto ao rendimento da produção, eficácia de encapsulamento, tamanho, morfologia, absorvidade (coeficiente de partição óleo-água, coeficiente de permeabilidade, perfil de dissolução *in vivo*, ensaio de permeação cutânea *in vitro* por método de *tape stripping*) e de estabilidade segundo legislação vigente RE 01/05 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), após estudo de degradação térmica do estigmasterol. Todos os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata, em confronto com solução hidroetanólica de estigmasterol e com micropartículas preparadas sem a adição do fármaco. A análise estatística foi realizada por meio de teste t de student bimodal pareado ($\alpha=0,05$) entre as amostras analisadas. Os resultados indicam que o revestimento lipídico favorece as propriedades absorptivas do fármaco, enquanto o revestimento protéico promove maior estabilidade ao estigmasterol.

Palavras chave: extração de fitoesteróides; microencapsulamento de fitoesteróides; diversidade de natureza de revestimento; estudo comparativo; absorvidade; proteção contra degradação.

ABSTRACT

Stigmasterol is a steroidal substance of vegetable origin present in most species. It has unexplored pharmacological properties like hypocholesterolemic, anti-inflammatory, antinociceptive and preventive of breast and prostate cancer. Its chemical structure is susceptible to oxidation beyond being absorbed by the organism in a decreased way. Thus, its microencapsulation is convenient because it would decrease the degradation and increase its absorption. Stigmasterol phytochemical extraction was made from 10.43kg of dry skin of ripe fruits of *Musa paradisiaca* L., Musaceae, using ethanol and later hexane. The hexanic extract was treated in solid-liquid partition with silica gel G in modified soxhlet apparatus, using solvent sequence of hexane, dichloromethane and chloroform. Crystallization was proceeded using petroleum ether, acetone and n-pentanol to obtain stigmasterol at 90.1% purity degree and with yield of 0.05% from dry vegetable mass. The extraction and crystallization process was controlled by TLC and HPLC, the purity degree was observed by GC-MS and the purified substance identity was confirmed as stigmasterol by FTIR. Then, were produced microparticles of the drug using different covering components intending a comparison of results of absorption and stability promoted by them. Protein cover was done with gelatin and coacervation method, while lipid cover was done with stearic acid and surfactants soy phosphatidylcholine and ethoxylated sorbitan monooleate by microemulsion polymerization method. Formed microparticles were valuated by production yield, entrapment efficacy, size, morphology, absorption (oil-water partition coefficient, permeability coefficient, dissolution test *in vitro*, cutaneous permeation assay *in vitro* by tape stripping method) and of stability according to valid law RE 01/05 of Brazilian Sanitarian Vigilance National Agency (ANVISA), after stigmasterol thermal degradation studies. All assays were done in duplicate or triplicate, confronting with hydroethanolic stigmasterol solution and microparticles prepared without drug adding. Statistical analysis was made by paired-samples student's t test ($\alpha=0.05$). Results show that lipid covering benefits the drug in absorptive properties while protein covering promotes stability to stigmasterol.

Key words: phytosteroids extraction; phytosteroids microencapsulation; different covering; comparative study; absorption; protection against degradation.

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos representam o primeiro estágio no caminho do desenvolvimento de medicamentos. Em sua maioria, os processos de obtenção de fármacos se realizam pela síntese de novas substâncias ou pela extração de princípios ativos de fontes naturais. Os fármacos obtidos raramente são administrados como substâncias químicas isoladas, mas sim, inclusos em uma forma farmacêutica para sua proteção, mascaramento de sabor, para solucionar problemas de incompatibilidades, melhorar a solubilidade ou direcionar o local de absorção através de liberação modificada (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

O estigmasterol, Δ^{22} -24-etil colesterol, é um fitoesteróide abundante em vegetais, detectado na maioria das espécies, inclusive *Musa* sp., envolvendo diversas famílias taxonômicas como Acanthaceae, Adoxaceae, Aloeaceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Annonaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Arecaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Cannabaceae, Caricaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Crassulaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Ginkgoaceae, Hippocastanaceae, Illiciaceae, Juglandaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Liliaceae, Loganiaceae, Lythraceae, Magnoliaceae, Malvaceae, Menispermaceae, Moraceae, Moringaceae, Musaceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Olacaceae, Onagraceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Pedaliaceae, Pinaceae, Piperaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Sarracenaceae, Scrophulariaceae, Smilacaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Theaceae, Tiliaceae, Urticaceae, Valerianaceae, Vitaceae, Zingiberaceae, Zygophyllaceae. As propriedades farmacológicas apontadas para o esteróide incluem a ação hipocolesterolêmica, cujo mecanismo sugerido é o impedimento da absorção intestinal de colesterol, além de anti-enrijecimento, antiinflamatório, antinociceptivo, e preventiva de câncer de mama e próstata. É extraído da fração não-saponificável de óleo de soja (*Glicine max* (L.) MERR., Fabaceae) e de fava de Calabar (*Physostigma venenosum* BALF., Fabaceae) (VAHOUNY *et al.*, 1983; WINDHOLZ *et al.*, 1983; AWAD, FINK, 2000; HALLING, SLOTTE, 2004; DUKE, 2006).

A espécie vegetal *Musa* sp., Musaceae, conhecida popularmente como bananeira, é abundantemente distribuída no Brasil, sendo nativa ou cultivada, para fins principalmente alimentares, pois a banana, seu fruto, é amplamente consumida por apresentar grande valor nutritivo. Desenvolve-se em todas as regiões tropicais do mundo e o fruto representa grande importância econômica em muitos países em desenvolvimento. Em termos de valor de produção, dentre os alimentos de colheita, a banana é o quarto mais importante do mundo, depois de arroz, trigo e milho (ARIAS *et al.*, 2003).

Entre os países produtores de banana destacam-se como mais importantes: Índia (16.000 mil toneladas), Equador (7.561 mil toneladas), Brasil (6.164 mil toneladas), China (5.516 mil toneladas) e Filipinas (5.080 mil toneladas), no período de 2001 a 2002. Outros produtores importantes são Indonésia, Costa Rica, México, Tailândia, Burundi e Venezuela (FIORAVANÇO, 2003), sendo que a cultura da banana está distribuída por todo o território brasileiro. Os principais estados produtores dessa fruta são Pará, São Paulo, Bahia, Amazonas, Minas Gerais e Santa Catarina. Cerca de 90% da produção destina-se ao mercado interno para comercialização da fruta *in natura* e para fins industriais (SOFFNER, 2001).

O consumo do fruto de *Musa* sp. para fins alimentares gera como resíduo principal a casca; embora muitos esforços têm sido feitos para a sua utilização como fonte de nutrientes, na grande maioria dos casos ocorre o seu descarte. O intuito de utilizá-la como fonte abundante e pouco dispendiosa para a extração do estigmasterol é favorecido também por não ser sujeito aos valores comerciais e a variações freqüentes de safra, quais sofrem as fontes do esteróide utilizadas atualmente. Os esteróides presentes em maior abundância nesta fonte vegetal são o estigmasterol e o β -sitosterol, sendo que apresentam ações biológicas semelhantes visto que são fitoesteróides, no entanto o estigmasterol apresenta maior semelhança estrutural com as substâncias hormonais de origem animal.

O estigmasterol é uma substância muito susceptível a degradação, especialmente por oxidação, além de apresentar baixa absorção pelo organismo, por via oral. Nesse contexto, o microencapsulamento como prática em Farmacotecnia voltada a promover aos fármacos melhoria de suas propriedades, em especial na proteção contra a degradação e vetores promotores de sua absorção, é

capaz também de facilitar a sua manipulação, aumentar a sua solubilidade e controlar a liberação e conseqüente biodisponibilidade, dentre outras.

Por definição, o microencapsulamento é o processo através do qual se envolve microscópicas quantidades de matéria (sólidos, gotículas de líquido ou mesmo material gasoso) com um fino filme de polímero, formando partículas denominadas micropartículas, que representam vetores farmacêuticos capazes de liberar seu conteúdo sob velocidades e condições específicas (MAGILL, 1991; LE HIR, 1997; SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000). Existem muitos materiais poliméricos para o revestimento de micropartículas, que definem as propriedades das mesmas e o grau de sua aplicabilidade para os diversos fins a quais são destinadas.

Sendo que a estrutura e propriedades das micropartículas dependem dos componentes envolvidos na sua preparação (SILVA, FERREIRA, 1998), é relevante a escolha do melhor método para conferir ao estigmasterol vantagens como a facilitação da sua absorção frente ao tecido epitelial, e a redução de perdas do fármaco por degradação oxidativa, visto que o microencapsulamento promove a ausência de contato direto com agentes desestabilizantes; justificando assim a comparação entre micropartículas compostas por material de revestimento protéico ou lipídico.

Tendo em vista as propriedades farmacológicas apontadas, a redução da degradação do estigmasterol promovida pelo microencapsulamento poderá favorecer a sua atividade hipocolesterolêmica, pois as moléculas quimicamente intactas do esteróide são mais eficientes no impedimento da absorção intestinal de colesterol (NAIR *et al.*, 1984). Enquanto o aumento da captação de microcápsulas contendo estigmasterol pelo tecido epidérmico, de modo a promover um aumento de sua absorção e biodisponibilidade no tecido-alvo, poderá permitir as suas atividades antinociceptiva e antineoplásica com maior efetividade.

1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir micropartículas contendo estigmasterol proveniente de cascas de frutos da espécie vegetal *Musa paradisiaca* L., Musaceae.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar cascas de frutos de *Musa paradisiaca* L., Musaceae como fonte para extração de estigmasterol

Microencapsular o estigmasterol com diferentes materiais de revestimento, com composição protéica ou lipídica, por métodos viáveis de microencapsulamento

Realizar estudo de estabilidade do fármaco para verificar a efetividade das micropartículas produzidas com diferentes componentes de revestimento

Analisar a atividade abortiva do fármaco *in vitro* para verificar a efetividade das micropartículas produzidas com diferentes componentes de revestimento

Comparar os diferentes tipos de micropartículas quanto à capacidade de promover estabilidade e abortividade ao fármaco, para a seleção da mais conveniente de acordo com as propriedades desejadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Musa paradisiaca* L., MUSACEAE

Musa paradisiaca (figura 1) foi primeiramente descrita em sua morfologia e taxonomia por Linnaeus em 1753 em sua obra 'Species Plantarum'. É conhecida pelo nome popular bananeira, o seu fruto é denominado banana, plátano (espanhol), banane, fon (alemão), kôdou (dioula – África), baranda poyo (Costa do Marfim) (GNU, 2006).

FIGURA 1 – IMAGENS DE *Musa paradisiaca* L., MUSACEAE



- (a) haste pendulosa contendo penca de frutos imaturos e brácteas avermelhadas envolvendo flores.
 (b) pseudocaule formado pela superposição de bainhas foliares que, dispendo-se em espiral, prolongam-se formando as folhas.
 (c) visualização aproximada das flores alvas envoltas por brácteas róseas, atraindo insetos para a polinização.
 (d) formação dos frutos a partir das flores fecundadas.

FONTE: GNU, 2006

Trata-se de uma espécie vegetal arbustiva, que pode atingir 7m de altura, não apresentando caule, mas um pseudocaule formado pela superposição de bainhas foliares verde-claras e brilhantes, reunidas em grupos de 25cm de diâmetro na base. As folhas são os prolongamentos das referidas bainhas foliares dispostos em espiral; apresentam-se simples, oblongadas, pecioladas, com coloração verde-clara, apresentam comprimento de 2m a 2,5 m e largura de até 60 cm, o limbo é inteiro com nervuras principal e secundárias nítidas. A bananeira é uma planta perene, o seu ciclo vegetal dura cerca de um ano: o pseudocaule floresce ao final de sete meses, frutifica apenas uma vez quatro meses depois, e então morre (MUDGE, LUCKOW, BRENNAN, 1995; GNU, 2006).

As inflorescências apresentam-se como uma haste, normalmente pendulosa, que suporta muitas brácteas avermelhadas envolvendo as flores de coloração clara. As plantas são monóicas, sendo que as flores fêmeas nascem no eixo das brácteas superiores e as flores machos surgem próximo ao final do talo. Existem cerca de 16 flores fêmeas em cada bráctea arranjadas em duas linhas, apresentando-se bilabiadas, sendo a pétala superior curvada para trás, possuindo o estigma e cinco estames estéreis. Na idade reprodutiva da planta, a bráctea abre-se e expõe as flores machos, quais usualmente possuem cinco estames férteis com anteras muito longas e lineares, sendo uma delas diferenciada morfológicamente, apresentando-se mais curta e mais rígida (MUDGE, LUCKOW, BRENNAN, 1995).

A fertilização das flores fêmeas promove o desenvolvimento dos frutos, que se dispõem em pencas, constituídas por dedos estruturados em duas fileiras horizontais e paralelas. O fruto é uma baga longa e curva, falciforme, apresentando comprimento de 8-13cm e largura de 1,5-3cm. A casca do fruto maduro é amarela, envolvendo a polpa de coloração creme, que não apresenta sementes (MUDGE, LUCKOW, BRENNAN, 1995).

A bananeira se reproduz assexuadamente (partenocarpicamente), por meio de brotos provenientes do rizoma subterrâneo, reiniciando um novo ciclo vegetativo. No decorrer do ciclo, vários brotos surgem continuamente, mantendo a produção de bananas durante cinco anos. Os brotos, com crescimento vigoroso, continuam a emergir a partir de apenas um rizoma ano após ano, fazendo das bananas uma baga perene com ciclo vegetativo anual (ARIAS *et al.*, 2003; GNU, 2006; NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006).

A sua classificação taxonômica é representada no seguinte quadro (DUARTE, 2001; SOFFNER, 2001; SILVOPASCICULTURA, 2005):

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Musa paradisiaca* L. SEGUNDO CRONQUIST E ENGLER

	CRONQUIST	ENGLER
Reino	Plantae	Plantae
Subreino	Tracheobionta	Tracheophyta
Superfilo	Spermatophyta	Spermatophyta
Filo	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Liliopsida	Monocotyledonae
Subclasse	Zingiberidae	
Ordem	Zigiberales	Scitaminae
Família	Musaceae	Musaceae
Gênero	Musa	<i>Musa</i>
Espécie	<i>Musa paradisiaca</i>	<i>Musa paradisiaca</i>

A família Musaceae é composta pelos gêneros *Ensete* e *Musa*. O gênero *Musa* inclui mais de sessenta espécies, e é dividida em quatro seções: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys*, *Eumusa*. As quatro seções são separadas em dois grupos distinguíveis pelo seu número de cromossomos, sendo o primeiro grupo constituído por *Australimusa* e *Callimusa*, bananeiras com número básico de dez cromossomos ($n=10$); e o segundo grupo por *Rhodochlamys* e *Eumusa*, bananeiras com número básico de onze cromossomos ($n=11$). Morfologicamente, a distinção destes grupos pode ser feita observando-se as brácteas: as bananeiras com dez cromossomos apresentam externamente brácteas lisas, enquanto as bananeiras com onze cromossomos apresentam brácteas onduladas. Pode-se também efetuar a contagem do número de cromossomos através das células das pontas das raízes. As seções *Rhodochlamys* e *Callimusa* produzem frutos não comestíveis. A espécie *Musa paradisiaca* enquadra-se na seção *Eumusa*, apresentando cachos e

inflorescência masculina horizontais ou cadentes, seiva leitosa ou aguada (SOFFNER, 2001; GNU, 2006).

A maioria das bananas consumidas mundialmente são os frutos de *Musa paradisiaca*, um híbrido entre as espécies *Musa acuminata* originária da Malásia e *Musa balbisiana*, encontrada na Índia e Filipinas. A bananeira cultivada exige solo bastante drenado, profundo, rico em nutrientes minerais e ligeiramente ácido; além de condições pluviométricas anuais de 1200 mm e temperatura superior a 15°C (GNU, 2006).

A região de origem da bananeira se encontra entre a Índia e as ilhas Molinésias do Pacífico, passando pela Indonésia e a Nova Guiné. Atualmente, a banana é cultivada em todas as regiões tropicais do planeta. O cultivo da banana foi introduzido nas Américas com a colonização européia, em cerca de 1500 (GNU, 2006).

Atualmente, a importância das bananas como uma fonte alimentar em regiões tropicais não pode ser subestimada. Em Uganda, por exemplo, o consumo anual per capita foi de, em média, 243 kg em 1996, e entre 100 e 200 kg em Ruanda, Gabão e Camarões. Nestes países, as bananas representam entre 12% e 27% do consumo diário de calorias da população. Os principais países produtores na América Latina são Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Honduras, México; na Ásia são China, Índia, Filipinas, Indonésia, Tailândia, Vietnam; na África são Burundi e Tanzânia (ARIAS *et al.*, 2003; GNU, 2006).

A produção mundial de banana é de aproximadamente 64,6 milhões de t/ano. A Índia ocupa o primeiro lugar com 13,9 milhões de t/ano, em segundo lugar encontra-se o Equador com 6,8 milhões de t/ano e em terceiro lugar encontra-se o Brasil com 6,3 milhões de t/ano. A cultura da banana está distribuída por todo o território brasileiro. Os principais estados produtores dessa fruta são Pará, São Paulo, Bahia, Amazonas, Minas Gerais e Santa Catarina. As espécies de banana mais cultivadas são *Musa sapientum*, cultivar prata; e *Musa cavendishii*, cultivares nanica e nanicão. Cerca de 90% da produção destina-se ao mercado interno para comercialização da fruta *in natura* e para fins industriais (SOFFNER, 2001).

O comércio internacional de banana é um objeto de conflito na Organização Mundial do Comércio (OMC) entre a União Européia e os países produtores da América, em razão dos acordos preferenciais (quotas e redução de direitos de

alfândega) que vinculavam este último aos países ditos ACP (África-Caribe-Pacífico) (GNU, 2006).

De fato, a utilização dos frutos de *Musa* para a alimentação é bastante significativo, se observarmos o valor nutritivo dos mesmos, conforme descrito no quadro 2.

QUADRO 2 – VALOR NUTRICIONAL DA BANANA

Nutriente	Quantidade /100g de banana
Calorias	103 kcal
Lipídeos	0,5 g
Gordura saturada	0,2 g
Gordura poliinsaturada	0,1 g
Hidrocarbonetos	23,5 g
Proteínas	1,0 g
Fibras	2,5 g
Água	74,3 g
Vitamina A	0,002 mg
Vitamina B9 (ácido fólico)	0,019 mg
Vitamina C	9,1 mg
Sódio	1,0 mg
Cálcio	6,0 mg
Fósforo	20,0 mg
Ferro	0,3 mg
Magnésio	29,0 mg
Potássio	396,0 mg
Nota complementar sobre o valor nutritivo: é fonte de riboflavina e de ácido fólico	

FONTE: GUIDE DES ALIMENTS, 2006

No entanto, existe também a inclusão de valor farmacológico em *Musa paradisiaca*, sendo que historicamente são reportados usos contra asma, bronquite, queimaduras, diabetes, disenteria, menorragia, febre, gangrena, gota, cefaléia, hemorragia, inflamação, insônia, sífilis, icterícia, tuberculose, convalescença, desnutrição, úlceras, feridas, verrugas, reumatismo, e como antihipertensivo e antihelmíntico (NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006).

As bananas imaturas são adstringentes, e utilizadas para tratar diarreia. As folhas são usadas contra tosse e bronquite. As raízes podem deter hemoptise e

possui forte adstringência além de propriedades antihelmínticas. A seiva pode ser utilizada para fins antiofídicos. A medicina tradicional do Suriname usava as brácteas róseas contra menorragia (NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006).

As atividades com evidência científica são: o uso da seiva para o tratamento antiofídico no leste da África (GRIEVE, 2006), estudos em animais demonstram que o extrato de frutos verdes de *Musa paradisiaca* reduz a glicemia em ratos normais e diabéticos (OJEWOLE, ADEWUNMI, 2003). Outras ações incluem a proteção da mucosa gástrica contra a úlcera induzida por ácido acetilsalicílico, estimulando a mucosa gástrica e colônica (LEWIS, FIELD, SHAW, 1999), o efeito de vasodilatação direta (ORIE, 1997), além da atividade antimicrobiana do extrato da raiz devido ao alto conteúdo de taninos (NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006; GOEL, GOVINDA, SANYAL, 1989). NGO, DVORKIN, WHELAN (2006) relatam ainda que a ação das folhas contra bronquite e resfriados, efetividade contra litíase, e efeito vaso-relaxante em musculatura lisa.

As informações quanto à toxicidade incluem o uso da seiva do pseudocaulé para fabricação de flechas venenosas na África, no entanto, ainda não foram reportadas toxicidade e contra-indicações em humanos, portanto, *Musa paradisiaca* é considerada uma planta não-tóxica. Estudos toxicológicos do extrato do pseudocaulé em ratos demonstraram não toxicidade por administração oral em uma dose de 2g/kg (GUEVARA *et al.*, 2003).

Em um estudo em animais, *Musa paradisiaca* demonstrou interação medicamentosa com antibióticos quinolônicos, reduzindo a sua absorção por conter muitos cátions polivalentes (NWAFOR *et al.*, 2003).

Os compostos químicos reportados como presentes em *Musa paradisiaca* incluem taninos, eugenol, tiramina, compostos fenólicos, antocianinas, sais minerais e vitaminas A, C, B1, B2, B5; serotonina, levarterenol, dopamina (fruto maduro e casca); alcalóides, ferro, e esteróides como beta-sitosterol e estigmasterol (NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006; DUKE, 2006).

2.2 OS FITOESTERÓIDES

Os fitoesteróides, por definição, são substâncias esteroidais ou terpenóides tetracíclicas extraídas de espécies vegetais, sendo as mais comuns o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (classificados como 4-desmetilesteróis do colestano, apresentando duplas ligações na posição C-5 do anel ciclopentanoperidrofenantênico) (figura 2).

Quimicamente, são álcoois constituídos por 28 ou 29 átomos de carbono, semelhantes ao colesterol, um álcool de 27 átomos de carbono presente em organismos animais, cujas modificações envolvem a cadeia lateral e incluem a adição de ligações insaturadas e/ou grupamentos metila ou etila, representadas nas estruturas químicas do quadro 3 (AWAD, FINK, 2000; NORMÉN et al, 2001).

QUADRO 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS FITOESTERÓIDES

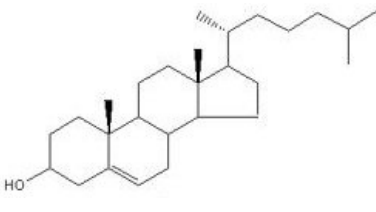
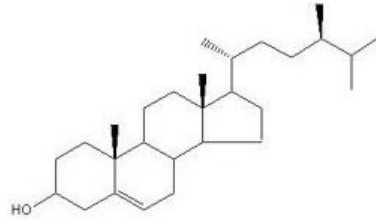
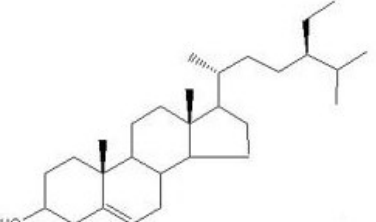
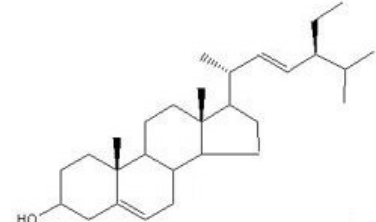
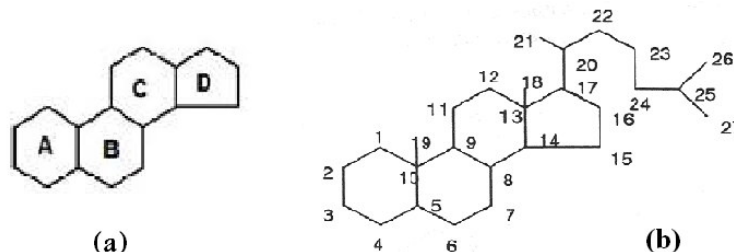
 <p style="text-align: center;">Colesterol</p>	 <p style="text-align: center;">Campesterol</p>
 <p style="text-align: center;">β-Sitosterol</p>	 <p style="text-align: center;">Estigmasterol</p>

FIGURA 2 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DE SUBSTÂNCIAS ESTEROIDAIIS



(a) anel ciclopentanoperidrofenantrênico; (b) sistema de numeração para substâncias esteroidais

O núcleo fundamental das substâncias esteroidais é constituído pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico ligado a dois grupamentos metila nas posições C-10 e C-13, e a cadeia lateral na posição C-17 apresenta número de átomos de carbono variável entre dois e oito. A nomenclatura esterol é aplicada especificamente para álcoois que apresentam o referido núcleo fundamental, para tanto, praticamente todos os fitoesteróides apresentam um grupamento hidroxila na posição C-3 (ROBINSON, 1991).

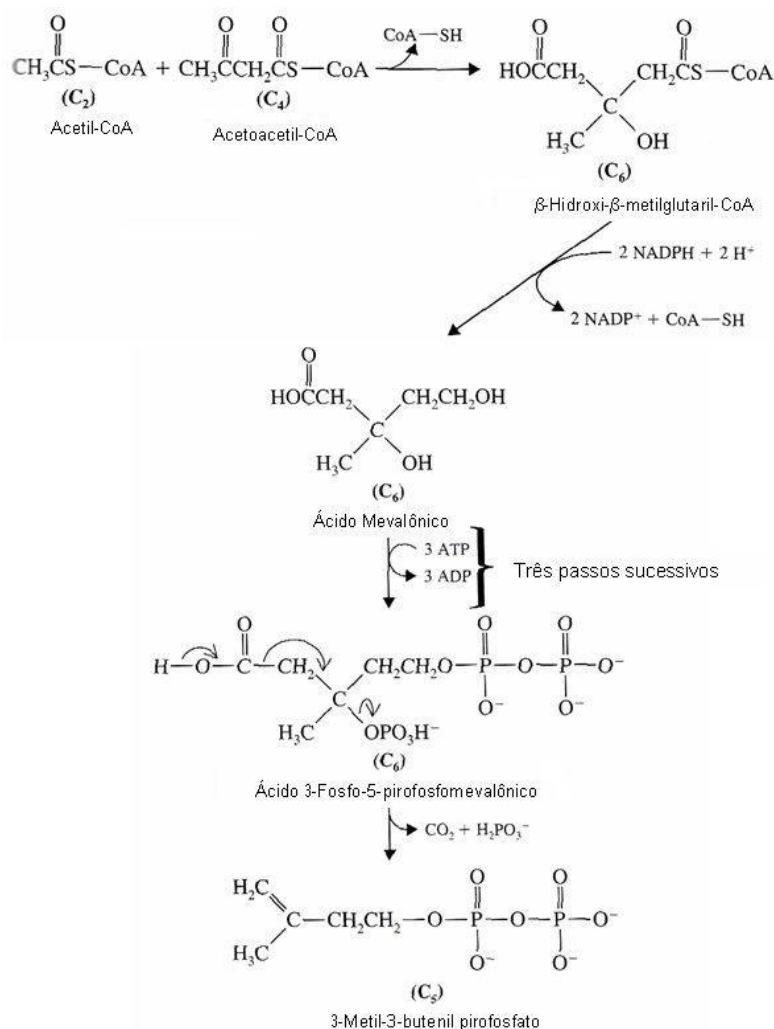
Tal grupo de substâncias está presente nas membranas celulares de espécies vegetais superiores, assumindo uma grande variedade de atividades biológicas específicas, em adição aos seus papéis como constituintes na bicamada lipídica. Em células vegetais, os fitoesteróides são encontrados em grande concentração também em frações particuladas das mesmas e no desenvolvimento de plastídios em cloroplastos, participando do transporte intracelular da fração microssomal para a fração cloroplástica (PRIDHAM, 1967; LEHNINGER, NELSON, COX, 1995).

As substâncias esteroidais presentes em vegetais freqüentemente ocorrem em sua forma não-livre, ou seja, como derivados mais complexos, como glicosídeos ou ésteres com ácidos graxos ou aromáticos. Os derivados glicosídicos são denominados esterolinas (ROBINSON, 1991).

Os esteróides são sintetizados intracelularmente a partir de acetil-CoA em uma série complexa de reações e com a participação de intermediários como β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, mevalonato e dois isoprenos ativados, o dimetilalil-pirofosfato e o isopentenil-pirofosfato. A condensação de unidades de isopreno produz o esqualeno, que sendo não-cíclico é ciclizado para liberar o anel esteróide e sua cadeia lateral (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995).

O início do processo se dá com a reação de condensação de unidades de acetato, formando mevalonato e a unidade isoprênica (3-metil-3-butenil-pirofosfato ou isopentenil-pirofosfato) composta por 5 átomos de carbono e utilizada na natureza para a síntese de esteróides e terpenóides. A etapa de formação de mevalonato é a chamada limitante da síntese, e é realizada pela enzima denominada HMG-CoA redutase. As referidas reações estão representadas na figura 3 (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995; SOLOMONS, FRYHLE, 1998).

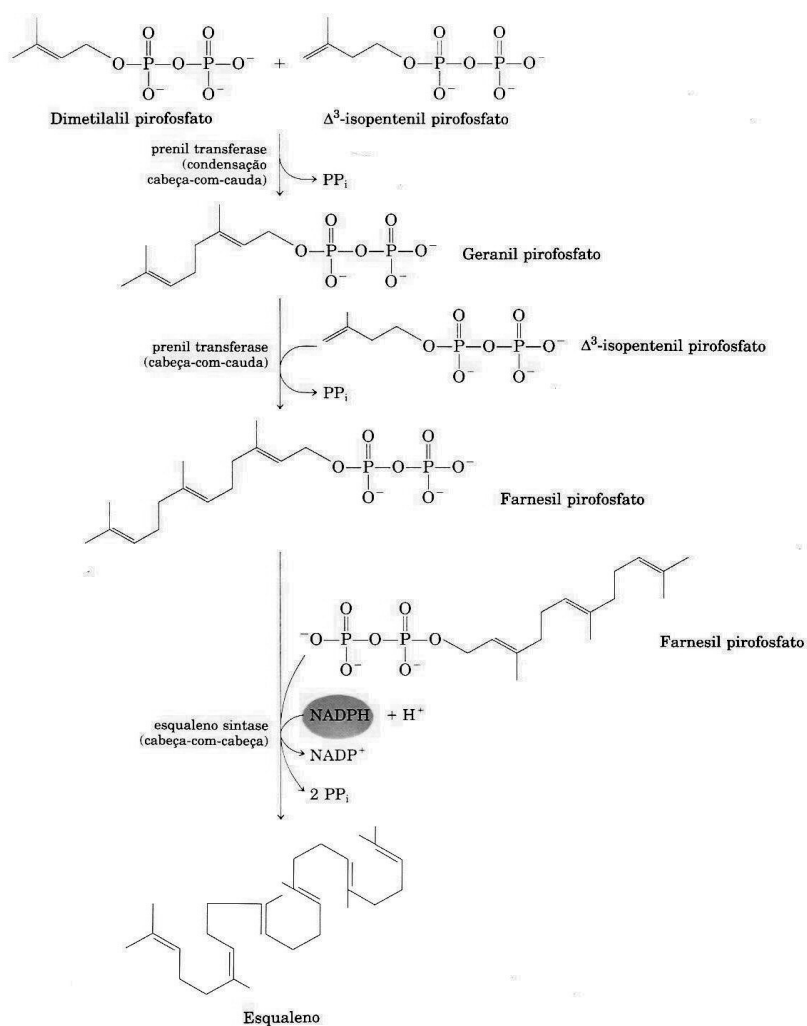
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA DE REAÇÕES PARA A FORMAÇÃO DE ISOPRENO



FONTE: SOLOMONS, FRYHLE, 1998

A unidade isoprênica formada isomeriza-se, resultando em uma mistura de 3-metil-3-butenil-pirofosfato e 3-metil-2-butenil-pirofosfato (ou dimetilalil-pirofosfato) no estado de equilíbrio químico, e estes dois compostos condensam-se para formar geranyl-pirofosfato (composto por dez átomos de carbono), qual subsequente condensa-se com 3-metil-3-butenil-pirofosfato gerando farnesil-pirofosfato (composto por quinze átomos de carbono). Duas moléculas de farnesil-pirofosfato, por sua vez, sofrem condensação redutiva formando esqualeno, o precursor direto dos esteróides, que sofre então oxidação para o fechamento dos anéis e a formação do núcleo ciclopentanoperidrofenantênico (figura 4) (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995; SOLOMONS, FRYHLE, 1998).

FIGURA 4 - BISSÍNTESE DE ESQUALENO A PARTIR DE CONDENSAÇÕES SUCESSIVAS DE UNIDADES DE ISOPRENO

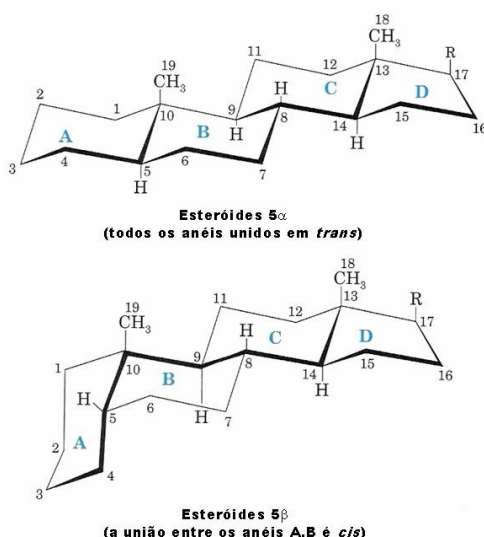


FONTE: LEHNINGER, NELSON, COX, 1995

A fusão dos anéis a partir do esqualeno permite a formação de um grande número de possíveis isômeros. A estereoquímica dos esteróides é dependente da conformação do sistema de anéis ciclopentanoperidrofenantreno.

Em esteróides de ocorrência natural, a fusão dos anéis B e C é sempre *trans*, e a dos anéis C e D freqüentemente *trans*, enquanto a fusão dos anéis A e B ocorre com igual freqüência em *cis* e *trans*. As conformações dos anéis A e B definem a classificação dos esteróides como α ou β , de acordo com a estrutura tridimensional demonstrada na figura 5. Verifica-se que o núcleo esteroidal é uma estrutura essencialmente planar, bastante rígida, com substituintes acima ou no plano dos anéis (β) ou abaixo (α) (STAHL, 1969; SOLOMONS, FRYHLE, 1998; DEVLIN, 1998).

FIGURA 5 - O SISTEMA DE ANÉIS BÁSICO DOS ESTERÓIDES E AS CONFORMAÇÕES 5 α E 5 β



FONTE: SOLOMONS, FRYHLE, 1998

O conhecimento da conformação dos substituintes é importante especialmente para as propriedades físico-químicas. Em esteróides 5 α , os anéis A/B são *trans* e o substituinte é perpendicular ao plano dos anéis (equatorial), enquanto que em esteróides 5 β , os anéis A/B são *cis* e o substituinte é angular em relação ao plano dos anéis (axial). Grupos funcionais em posição equatorial são, em geral,

2.2.1 Ação Hipocolesterolêmica

Embora haja controvérsias sobre o uso de fármacos hipocolesterolêmicos para a prevenção primária de aterosclerose em adultos jovens, a intervenção dietária para reduzir os níveis séricos de colesterol total e de LDL-colesterol representa uma medida sensível e bem aceita para diminuir a morbidade e a mortalidade da doença cardiovascular. Em geral, dietas para redução de colesterol apresentam pouca gordura total, gordura saturada e colesterol, porém não são suficientemente palatáveis para induzir a aderência em tempo prolongado necessário para beneficiar a saúde (MATVIENKO *et al.*, 2002). Portanto a importância do estudo de fitoesteróis para o uso nutracêutico, visto que apresentam efeito hipocolesterolêmico.

Nesse contexto, MATVIENKO e colaboradores (2002) promoveram um estudo *in vivo* em 36 homens caucasianos voluntários com hipercolesterolemia, utilizando mistura de fitoesteróis contendo 48% de β -sitosterol e 21% de estigmasterol, inserida na dieta por 4 semanas. Elucidou-se a capacidade de redução do colesterol total e do LDL-colesterol sem alteração dos níveis séricos de HDL-colesterol e triglicérides, o que é vantajoso para evitar a aterosclerose. Os autores afirmam que a redução no LDL-colesterol resultou primariamente de redução no número de partículas de LDL, que não sofreram influência no seu tamanho porque os níveis de triglicerídeos não são afetados. O mecanismo de ação sugerido envolve saturação do enterócito e prolongamento da presença do fitoesteróide dentro da célula, inibindo deste modo a absorção intestinal do colesterol biliar e da dieta, além de inibir a esterificação do colesterol pelos enterócitos e causar difusão ou transporte do colesterol não esterificado ao lúmen intestinal.

2.2.2 Ação Anticancerígena

O câncer é originário de alterações que não somente promovem a proliferação celular, como também aumentam a frequência com a qual as células mutantes e resistentes a fármacos escapam aos mecanismos normais de vigilância e apoptose. A transformação maligna é favorecida por conseqüências do mau funcionamento de eventos no ciclo celular que monitoram a integridade do DNA e detém a progressão do ciclo celular quando faltam nutrientes ou fatores de crescimento, dirigindo a célula para sofrer apoptose quando fatores intrínsecos ou extrínsecos são desfavoráveis à sobrevivência. Mais especificamente, uma perda dos pontos de controle do ciclo celular

(como a mutação ou deleção dos oncogenes p53 e p16), uma superexpressão nos genes que protegem as células da apoptose (como o gene *bcl-2* que está translocado nos linfomas nodulares) e um aumento na expressão da ciclina D (o oncogene *prad*), que promove a entrada celular em síntese de DNA (GOODMAN-GILMAN, 1996).

Embora a atual terapia para câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação normal e maligna proporcionou uma miríade de novos alvos possíveis para o tratamento do câncer (GOODMAN-GILMAN, 1996, p. 942).

O desenvolvimento de fármacos para câncer emerge da pesquisa em biologia tumoral e inclui indutores de diferenciação (ácido retinóico-*trans*-todo, outros retinóides, agentes hormonais, substâncias planares-polares e análogos da vitamina D) e inibidores da angiogênese (fatores de crescimento endotelial, inibidores da formação do citoesqueleto de actina em células endoteliais) e da metástase, agentes imunológicos dirigidas contra antígenos exclusivos de tumores – por exemplo produtos de oncogenes ou produtos de genes translocados (GOODMAN-GILMAN, 1996).

Portanto, um grande esforço está sendo feito para identificar compostos que restaurem a apoptose e os pontos de controle do ciclo celular (GOODMAN-GILMAN, 1996).

Recentemente, o interesse no estudo de fitoesteróides tem aumentado na área oncológica, visto que estudos têm demonstrado ação protetiva contra câncer de próstata, de mama e de cólon. AWAD e FINK (2000) descrevem em seu trabalho de revisão bibliográfica tais investigações. Remetem à normalização da hiperproliferação de colonócitos e redução do compartimento proliferativo da cripta após ingestão dietária de fitoesteróides em estudos *in vivo*, além de inibição de crescimento tumoral *in vitro* para cultivos celulares HT-29 (câncer de cólon), LNCaP (câncer de próstata) e MDA-MB-231 (câncer de mama), com resultados indicando redução de números de células tumorais.

Os carcinomas originados nos órgãos dependentes de hormônios para o seu crescimento, função e integridade morfológica, como a próstata e a glândula mamária, muitas vezes retêm alguma responsividade hormonal das suas contrapartes normais durante variados períodos de tempo. Através da alteração do

ambiente hormonal desses tumores é possível alterar a evolução do processo neoplásico. Em condições fisiológicas normais, a estimulação estrogênica aumenta a produção, pela célula tumoral, de fator de crescimento de transformação β (TGF- β), um inibidor autócrino do crescimento das células tumorais que atua especialmente na fase G1 do ciclo celular (GOODMAN-GILMAN, 1996).

O mecanismo exato pelo qual os fitoesteróides oferecem proteção contra o câncer não é elucidado, porém há teorias propostas que envolvem (1) efeito sobre a estrutura de membranas celulares, (2) efeito sobre a fluidez de membranas celulares, (3) efeito sobre enzimas ligadas à membrana, (4) efeito sobre vias de transdução de sinais, (5) efeito sobre a apoptose, (6) efeito sobre a integridade da membrana, (7) efeito sobre a função imunológica, (8) efeito sobre propriedades esterogênicas nos tecidos, (9) efeito sobre esteróides ácidos e neutros no cólon (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.1 Efeito sobre a estrutura de membranas celulares

O efeito na estrutura da membrana deve-se à similaridade com o colesterol e, portanto à incorporação nas membranas celulares com alteração na concentração de esfingomielina (redução de 50%) e fosfatidilcolina (aumento de 8%), fato que sugere alteração em algumas vias de transdução de sinal. Quando se investigou o acúmulo de fitoesteróides incorporados nas membranas celulares de diversos tecidos, verificou-se que os fitoesteróides tendem a acumular-se no tecido adiposo e nos microssomas hepáticos, além de promover redução de 25% no colesterol nos testículos. Não houve efeito na composição fosfolipídica das membranas estudadas (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.2 Efeito sobre a fluidez de membranas celulares

A fluidez da membrana é influenciada pela incorporação de fitoesteróis na membrana celular, pois altera a sua composição lipídica; vale recordar que as propriedades e funções da membrana são dependentes das características de fluidez da membrana celular. AWAD e FINK (2000) descrevem que a incorporação de fitoesteróis na membrana de hepatócitos de ratos promoveu redução da fluidez, e conseqüentemente aumento das atividades de várias enzimas hepáticas

desaturases de ácidos graxos ($\Delta 9$, $\Delta 6$ e $\Delta 5$), provavelmente como um mecanismo compensatório pela diminuição da fluidez.

A desaturase é um complexo enzimático que insere dupla ligação no interior da cadeia do ácido graxo, por uma reação oxidativa a partir de oxigênio molecular. Possui dois substratos, NADPH e o ácido graxo, que perdem contemporaneamente um par de elétrons, quais fluem por uma via constituída por um citocromo (citocromo b5), e uma flavoproteína (citocromo b5 redutase), presentes no retículo endotelial liso (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995).

O aumento da relação ácidos graxos insaturados / ácidos graxos saturados provoca redução da colesterolemia provavelmente em nível de lipoproteínas, ou mesmo aumenta a disponibilização de substrato para reações bioquímicas de redução, oxidação, hidratação, ou para a formação de prostanóides (prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos). A redução de colesterol sérico deve-se à redução do seu transporte pelas lipoproteínas. Os triglicerídeos endógenos biossintetizados a partir de ácidos graxos insaturados são transportados pelas lipoproteínas VLDL, que se originam no fígado e intestino delgado, e são catabolizadas rapidamente em um metabólito intermediário de vida curta (IDL), que é ulteriormente degradado a LDL – que corresponde ao principal carreador de colesterol e é correlacionada à oxidação do esteróide e a formação de placas aterogênicas como resultado de um processo inflamatório (GOODMAN-GILMAN, 1996; DEVLIN, 1998).

2.2.2.3 Efeito sobre enzimas ligadas à membrana

A incorporação de fitoesteróis em membranas resulta em aumento nas atividades de algumas desaturases de ácidos graxos no fígado. Quanto a outros tecidos, AWAD e FINK (2000) relatam em seu artigo de revisão bibliográfica um estudo envolvendo uma diminuição de 33-44% na atividade da 5 α -redutase hepática e prostática e de 55% na aromatase prostática em ratos alimentados com uma dieta contendo 2% de fitoesteróis. Ambas as enzimas estão envolvidas no metabolismo da testosterona, sendo o hormônio o seu produto final em situações de níveis elevados de andrógenos e estrógenos, respectivamente, implicando no desenvolvimento de hiperplasia prostática e câncer prostático. Com isso, se pode

sugerir uma associação entre baixas incidências de câncer prostático em Asiáticos e vegetarianos com dietas de alto teor de fitoesteróides.

Um outro estudo citado por AWAD e FINK (2000) demonstra que a incubação *in vitro* de membranas prostáticas de pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna com fitoesteróides em concentrações de 10^{-3} a 10^{-6} mol/L inibe a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na proporção de 23-67%, sugerindo que a supressão do metabolismo e crescimento das células prostáticas ocorre por este mecanismo.

2.2.2.4 Efeito sobre as vias de transdução de sinal

Segundo AWAD e FINK (2000), foram investigadas duas vias de transduções de sinal, proteína quinase C (PKC) e ciclo da esfingomielina, para explicar a inibição do crescimento tumoral por fitoesteróis. Estudos *in vivo* em mucosa de ratos *in vitro* em cultura de células HT-29 (câncer de cólon) demonstraram que os fitoesteróis não têm efeito sobre a via da proteína quinase C, por meio da não-alteração da atividade das enzimas fosfolipase C (que catalisa a geração de dois segundos mensageiros, inositol trifosfato e diacilglicerol).

No entanto, existem mudanças no padrão fosfolipídico da membrana de células HT-29 suplementadas com fitoesteróides, especialmente em esfingomielina. A investigação da sua atividade sobre o ciclo da esfingomielina em células HT-29 e LNCaP (câncer de próstata) revelou a ativação do ciclo e produção aumentada de ceramida, o segundo mensageiro desta via de transdução de sinal. Muitos estudos sugerem a ativação de proteína fosfatase 2A (PP2A) pela ceramida como um passo intermediário para a ação da ceramida no crescimento celular e apoptose. A suplementação com fitoesteróides aumentaram a atividade mas não a quantidade de PP2A em células LNCaP (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.5 Efeito sobre a apoptose

O grau de crescimento tumoral é dependente de um balanço entre a proporção de proliferação celular e apoptose. Os fitoesteróides são capazes de estimular a apoptose na concentração de $16\mu\text{mol/L}$ por três dias de tratamento em células MDA-MB-231 (câncer de mama) e LNCaP. O mecanismo de ação envolve o aumento de atividade da enzima PP2A em células LNCaP porém não ocorre em células MDA-

MB-231, indicando a existência de um outro mecanismo de ação estimulador de apoptose por estas substâncias (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.6 Efeito sobre a integridade da membrana

O tratamento de uma linha de células de câncer de mama com fitoesteróides na maior concentração permitida pelo grau de solubilidade (16 μ mol/L) não apresentou efeito na liberação de desidrogenase láctica, usada como um índice para integridade de membrana. Portanto, fitoesteróides não apresentam citotoxicidade quando em níveis fisiológicos (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.7 Efeito sobre a função imunológica

Estudos demonstram que fitoesteróides estimulam a proliferação de linfócitos periféricos sanguíneos *in vitro*, além de um aumento na proliferação de linfócitos T *in vivo*, em voluntários, após ingestão de 60mg/dia de uma mistura de fitoesteróis por quatro semanas. São necessários estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação dos fitoesteróides no estímulo da função do sistema imune (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.8 Efeito sobre propriedades esterogênicas nos tecidos

Tendo em vista que os receptores estrogênicos participam no desenvolvimento de tumores de órgãos sexuais, as propriedades estrogênicas dos fitoesteróides foram avaliadas. Demonstrou-se que peixes desenvolvem infertilidade quando expostos a grandes concentrações de polpa de madeira na água, qual é rica em fitoesteróides. No entanto, estudos em mamíferos utilizando fitoesteróides não demonstram nenhum efeito estrogênico *in vivo* ou *in vitro*, portanto os fitoesteróides não se ligam aos receptores estrogênicos e não afetam o peso uterino de ratas em idade não fértil, não aumentam a transcrição de receptores estrogênicos humanos em leveduras, não estimulam o crescimento de células MCF-7 (câncer de mama) responsivas a estrógenos em cultura. Portanto, os resultados obtidos em peixes podem ser devidos a outros componentes na polpa de madeira (AWAD, FINK, 2000).

2.2.2.9 Efeito sobre esteróides ácidos e neutros no cólon

Sabe-se que o colesterol e ácidos biliares primários são convertidos respectivamente em coprostanol e ácidos biliares no intestino grosso por ação bacteriana; e a presença destes esteróides modificados no conteúdo colônico pode participar do desenvolvimento de câncer de cólon. Os fitoesteróides da dieta alteram o nível dos esteróides fecais, e o mecanismo pode incluir a ação dos fitoesteróides sobre as bactérias colônicas e a alteração da absorção do colesterol (AWAD, FINK, 2000).

Atualmente, existe a necessidade de aprofundar os estudos para a elucidação de mecanismos pelos quais os fitoesteróides influenciam o crescimento celular e a apoptose de células tumorais, além de verificar se a concentração de fitoesteróis capaz de promover a proteção contra câncer é a mesma capacitada a promover hipocolesterolemia. Também se faz interessante investigar a interação entre os fitoesteróides e outros compostos para a proteção contra o câncer.

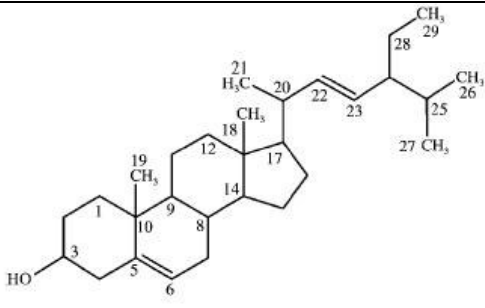
2.3 O ESTIGMASTEROL

O estigmasterol (com sinônimos estigmasta-5,22-dien-3 β -ol, 3 β -hidroxi-24etil- $\Delta^{5,22}$ -colestadieno (WINDHOLZ *et al*, 1983)) é um composto químico de natureza esteroidal triterpenóide, considerado um dos mais difundidos entre as espécies vegetais superiores, assim como o β -sitosterol e o campesterol (PRIDHAM, 1967; HELLGREN, SANDELIUS, 2001). É tido como ativo anti-enrijecimento, baseado no saneamento do sintoma desenvolvido em cobaias com síndrome de deficiência de origem dietária. O seu isolamento primordial foi realizado em 1906 por Windaus e Hauth, a partir de fava de Calabar. Posteriormente, foi isolado da mistura de esteróides do óleo de soja, na proporção de 12-25% da fração não saponificável. A sua obtenção para fins comerciais é procedida a partir da mistura de fitoesteróis da soja ou sementes de fava de Calabar (*Physostigma venenosum*). (FIESER, FIESER, 1959; WINDHOLZ *et al*, 1983).

Os esteróides característicos de espécies vegetais superiores apresentam semelhança à estrutura do colesterol, porém com a ligação de cadeias laterais adicionais à estrutura ciclopentanoperidrofenantrênica em C-24. Especificamente, o estigmasterol apresenta a ligação de um grupamento etila na referida posição, aliado a dupla ligação *trans* em Δ^{22} (PRIDHAM, 1967).

Como propriedades físico-químicas, o estigmasterol apresenta-se sob a forma de cristais amorfos brancos, insolubilidade em água e solubilidade nos solventes orgânicos usuais, ponto de fusão 170°C, desvio rotatório $[\alpha]_D^{25} = -51^\circ$. Estruturalmente, sua fórmula molecular é representada por $C_{29}H_{48}O$, peso molecular 412,67 g/mol e estrutura química representada no quadro abaixo (WINDHOLZ *et al*, 1983; LIM *et al*, 2005).

QUADRO 5 – ESTRUTURA QUÍMICA NUMERADA DO ESTIGMASTEROL

	<p>Ligação de grupamento hidroxila em C-3</p> <p>Ligação de grupamentos metila em C-10 e C-13</p> <p>Ligação de radical colestano em C-17, com dupla ligação entre C-22 e C-23</p>
---	--

O estabelecimento da sua fórmula empírica foi realizado a partir de reações químicas que indicaram a presença de dois átomos de carbono a mais do que o colesterol, e o isolamento de etil-isopropil-acetaldeído como um produto de ozonização estabelecendo a presença de um grupamento etila em C-24 e uma dupla ligação entre C-22 e C-23, reconhecida como *trans* pela presença de uma banda característica em 10,3 μ m (970 cm⁻¹) no espectro resultante por submissão a irradiação infravermelha. Além disso, a dupla ligação entre C-5 e C-6 é mais reativa do que aquela na cadeia lateral, e o derivado acético reage com um equivalente de brometo resultando em um derivado 5,6-dibromo; confirmado por outras reações, que envolvem a conversão do derivado 5,6-óxido em um triol e uma 3,6-diona. A posição do grupamento hidroxila foi estabelecida por oxidação com ácido crômico, resultando em 3 β -acetoxi-bisnoralocolato (FIESER, FIESER, 1959).

Os fitoesteróides são sujeitos à oxidação quando expostos ao ar, semelhantemente ao colesterol, tendo em vista a semelhança estrutural, em especial a dupla ligação entre C-5 e C-6, tendo como produto final o derivado 7-ceto (BERGSTRÖM, WINTERSTEINER, 1942). A oxidação dos mesmos pode ser aumentada pelo calor, radiação ionizante, exposição à luz ou por catalisadores químicos, podendo iniciar-se também pelo ataque de um radical oxigênio com singlete altamente reativo, como ocorre na foto-oxidação (gerando uma reação em cadeia de radicais livres, denominada auto-oxidação, muito comum em esteróides, na presença de oxigênio, energia luminosa e foto-sensibilizadores). O oxigênio singlete é altamente eletrofílico e reage rapidamente com as duplas ligações do esteróide por um mecanismo *eno* cíclico que resulta na inserção de oxigênio em um dos átomos de carbono da dupla ligação. Em todos os casos, os produtos de oxidação primários instáveis são os derivados hidroperóxidos das estruturas oxidadas, que dão origem aos produtos de oxidação secundários, quais apresentam vários grupos funcionais químicos – hidroxil, ceto e epóxi derivados (SÄYNÄJOKI *et al.*, 2003).

Assim como outras substâncias esteroideais naturais (sarsapogenina, ergosterol, sarmetogenina, ácido cólico), o estigmasterol é utilizado para a síntese de hormônios esteroideais que são utilizados para o tratamento em seres humanos, especialmente a cortisona. No entanto, a sua abundância na mistura de esteróides

do óleo de soja fez do estigmasterol uma das matérias-primas mais abundantes para a síntese de hormônios esteroidais. A síntese destes hormônios a partir de esteróides naturais envolve um processo complexo com envolvimento de vários passos de reação (FERGUSON, 1956; FIESER, FIESER, 1959).

Atualmente, outras utilizações são reportadas ao estigmasterol. LIM e colaboradores (2005) relataram o estigmasterol como sendo a substância com maior atividade antimutagênica em *Gleditsia sinensis* Lam., Leguminosae, obtendo como resultados 51,2% e 64,2% de redução do fator de indução contra os mutagenes MNNG (N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina) e 4-NQO (4-nitroquinolina-N-óxido), respectivamente, por meio de ensaio *in vitro*, remetendo à indicação da sua aplicação como agente anticancerígeno, porém ressaltando a necessidade de estudos *in vivo*. Substâncias com potencial antimutagênico aumentam a eficiência dos mecanismos de reparo das mutações causadas por agentes mutagênicos ou provocam a inativação da substância mutagênica. Como consequência, estas substâncias atuam como agentes protetores, diminuindo a frequência de danos ao DNA. Em ambos os casos, no entanto, agem antes da multiplicação desordenada das células, ou seja, da formação do tumor (REZENDE *et al.*, 2004).

SANTOS e colaboradores (1995) determinaram a ação antinociceptiva dose-dependente do estigmasterol em camundongos por meio de constrição abdominal induzida por ácido acético (ED₅₀ de 16 mg/kg) e nocicepção induzida por formalina obtendo resultados positivos em ambas as fases neurogênica e inflamatória, porém com maior efetividade na segunda fase (ED₅₀ de 41 mg/kg) e sem ação sobre o edema causado por formalina. Com tais resultados, pode-se sugerir que o esteróide participa da ação antinociceptiva observada em *Phyllanthus corcovadensis*.

2.4 MICROENCAPSULAMENTO

O microencapsulamento é o processo através do qual se envolve microscópicas quantidades de matéria (sólidos, gotículas de líquido ou mesmo material gasoso) com um fino filme de polímero, formando micropartículas denominadas microesferas ou microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidades e condições específicas, e morfologicamente apresentam dimensões de no máximo 1mm (MAGILL, 1991; JATO, 1997; SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000). Incluso na prática de microencapsulamento está o nanoencapsulamento, o qual resulta em partículas de dimensões menores – de até 1 μm (denominadas nanoesferas, nanopartículas ou nanocápsulas), enquanto micropartículas apresentam diâmetro de 1 a 100 μm (JATO, 1997; SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000).

O termo nanopartícula é utilizado como nome generalizado para descrever nanoesferas e nanocápsulas. A diferença entre essas duas formas reside em sua morfologia e arquitetura do seu corpo. Nanoesferas são formadas por uma matriz densa polimérica, enquanto nanocápsulas são compostas de um núcleo oleoso envolvido por uma membrana polimérica (QUINTANAR-GUERREIRO *et al.*, 1998, p. 1114).

As substâncias ativas estão dissolvidas ou dispersadas na estrutura sólida das microesferas ou nanoesferas, enquanto que em microcápsulas ou nanocápsulas, os ativos estão contidos no seio do seu invólucro ou cápsula sólida (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999). O material polimérico de revestimento forma uma rede tridimensional, onde o fármaco pode ser adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

A obtenção de um tipo de estrutura ou outro depende das propriedades físico-químicas da substância ativa e do material de revestimento, assim como do processo tecnológico utilizado (JATO, 1997).

2.4.1 Funções do Microencapsulamento

Trata-se de um procedimento utilizado em Farmacotecnia para promover melhor penetração intracelular do fármaco, proteção contra a inativação enzimática antes de atingir seu local de ação no organismo, direção do fármaco através da corrente sanguínea ou do trato gastrointestinal permitindo maior especificidade acompanhada por distribuição corporal mais restrita, separação de incompatibilidades nas preparações, melhora da estabilidade de produtos por conferir proteção ambiental, conversão de líquidos em sólidos, redução da volatilidade ou inflamabilidade de líquidos, mascaramento de sabor desagradável, redução de toxicidade de fármacos, melhora da manipulação de insumos durante a preparação, controle do tamanho das partículas, controle da liberação de insumos em geral (MAGILL, 1991; GASPAR, 1991; DUCHÊNE, WOUESSIDJEWE, GILLES, 1999).

Nesse contexto, são formados então vetores farmacêuticos, visto que

A vetorização pode ser considerada como uma operação visando modular e, se possível, dominar totalmente a distribuição de um princípio ativo no organismo, associando-o a um sistema apropriado chamado vetor da substância em questão (LE HIR, 1997, p. 226)

Os vetores tornam a distribuição da sustância no organismo o mais independente das suas propriedades, porém submetida às propriedades do vetor, em função do alvo a ser atingido. Didaticamente, os vetores podem ser classificados em: (a) Vetores de primeira geração, capazes de liberar progressivamente seu conteúdo e apresentam tamanho de cerca de 200 μm , como exemplos figuram-se as microesferas e as microcápsulas; (b) Vetores de segunda geração, capazes de atingirem o alvo independentemente da forma como são administradas, apresentam tamanho coloidal (menos de 1 μm), e como exemplos podem ser citadas as nanoesferas e nanocápsulas, assim como os lipossomas; (c) Vetores de terceira geração, capazes de reconhecer o alvo desejado, destacando-se neste grupo os vetores coloidais dotados de proteínas ou substâncias passíveis de reconhecimento por receptores contidas em seu revestimento, como por exemplo nanoesferas, nanocápsulas ou lipossomas pilotados por um anticorpo monoclonal (LE HIR, 1997).

A estrutura das micropartículas depende do material e métodos envolvidos na sua preparação.

2.4.2 Materiais de Revestimento e Metodologias de Preparo de Micropartículas

São inúmeros os materiais que se utilizam no revestimento, sendo os mais utilizados: polissacarídeos naturais (amido, dextrinas) ou modificados (carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose), gomas (arábica, carragena, alginato de sódio), materiais protéicos (glúten, caseína, gelatina, albumina, quitosana), ceras, lipídios (parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos) e um grande número de polímeros sintéticos (derivados do acrilato). Por sua vez, as técnicas utilizadas para o microencapsulamento de substâncias ativas podem ser divididas em métodos físicos (*spray drying*, pulverização em banho térmico, leiteo fluidizado), químicos (inclusão molecular, polimerização interfacial, *salting out*) e físico-químicos (coacervação, separação por fase orgânica, pulverização em agente formador de reticulação, envolvimento lipossômico) (SILVA, FERREIRA, 1998; SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000).

Além dos parâmetros inerentes ao processo de encapsulamento, a retenção do agente ativo nas cápsulas é governada por fatores relacionados à natureza química do recheio, incluindo o peso molecular, a funcionalidade química, a polaridade, a volatilidade relativa e sua difusividade (SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000, p. 26).

O revestimento das micropartículas pode ser impermeável, permeável ou semipermeável (VOIGT, BORNSCHEN, 1982); dentre os seus componentes demonstram importância aqueles constituídos de lipídeos fisiológicos e biodegradáveis, sólidos a temperatura ambiente, capazes de transportar moléculas hidrofílicas, lipofílicas ou pouco solúveis em água. A principal vantagem oferecida por este tipo de micropartículas, é o fato que os lipídeos são bem tolerados pelo organismo, não apresentando citotoxicidade como a maioria das matrizes poliméricas. No entanto, a metodologia de preparo pode envolver a utilização de solventes orgânicos cujos traços presentes na preparação final podem acarretar em toxicidade (MÜHLEN, SCHWARZ, MEHNERT, 1998; MÜLLER, MÄDER, GOHLA, 2000; SCHUBERT, MÜLLER-GOYMANN, 2003). Os perfis de liberação dos fármacos obtidos por micropartículas lipídicas são moduláveis de acordo com a concentração de surfactantes e a composição da matriz lipídica, além de parâmetros de produção, mas não são afetados pelo tamanho e forma da partícula (MÜLLER,

MÄDER, GOHLA, 2000). O método padrão de produção de micropartículas lipídicas é a homogeneização a alta temperatura, no entanto, existem ainda as técnicas de precipitação de emulsões e microemulsões contendo solventes orgânicos, polimerização de microemulsões, além de injeção de solvente desenvolvida por SCHUBERT, MÜLLER-GOYMANN (2003).

Tendo em vista que a capacidade de incorporação de micropartículas de lipídeos sólidos convencionais é limitada pela solubilidade do fármaco no lipídeo fundido, pela estrutura e pelo estado polimórfico da matriz lipídica (a utilização de moléculas similares e com cristalização perfeita reduz a incorporação de fármacos, pois estes se instalam entre as imperfeições cristalinas, cadeias de ácidos graxos e camadas lipídicas), foram desenvolvidas microestruturas para superar estas dificuldades das nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN): carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e o conjugado fármaco-lipídeo (LDC). As NLC são compostas de misturas de lipídeos sólidos e líquidos e/ou diferentes estericamente, formando imperfeições cristalinas e espaços onde podem se acomodar as moléculas de fármaco, no entanto, é necessário que a substância ativa seja lipofílica. Contudo, as LDC são capazes de incorporar drogas hidrofílicas com capacidade superior a 33%, por meio da formação de um conjugado fármaco-lipídeo insolúvel por formação de sal (de ácido graxo, por exemplo) ou por ligação covalente (WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

Quanto a material de revestimento de natureza protéica a gelatina apresenta-se primordial, sendo amplamente utilizada ainda atualmente como polímero em produtos farmacêuticos, por ter origem natural, grande disponibilidade a baixo custo, oferecendo redução de problemas envolvendo toxicidade e biodegradabilidade em comparação com os materiais sintéticos. Ainda, este polímero apresenta propriedades bioadesivas que poderiam resultar no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos aptos a sítar tecidos mucosos (como olhos, boca, epitélios nasal, gastrointestinal e urinário) (CORTESI, NASTRUZZI, DAVIS, 1998).

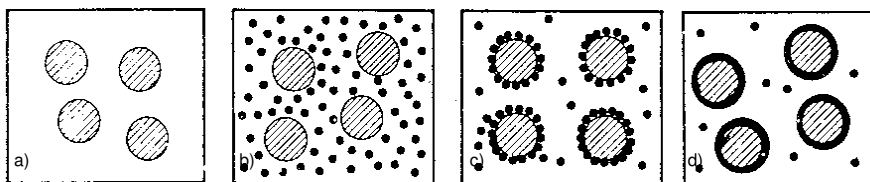
Pode ser destacada também a quitosana, um derivado desacetilado da quitina extraído da carapaça de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos. Por ser não tóxica e biodegradável, tem sido usada como matriz de nanopartículas e sistemas reticulados para imobilização e liberação de fármacos. GONÇALVES e colaboradores (2005) utilizaram-se da capacidade seletiva da

quitosana de capturar metais de transição por meio de troca iônica, sorção e quelação, para produzir micropartículas de ferro (III) passíveis de serem utilizadas no tratamento de anemia ferropriva que promovem a liberação em condições similares às do estômago; reticuladas com epícloridrina ou glutaraldeído para o aumento da estabilidade da preparação.

Quanto aos processos de preparo de micropartículas, impõe-se como pioneiro o método da coacervação, que ocorre principalmente em quatro etapas (figura 6): (a) a substância a ser encapsulada (núcleo) é dispersa em uma solução coloidal contendo o material de revestimento; (b) promove-se a redução da solubilidade do material de revestimento – por variação do pH, da temperatura ou por adição de eletrólitos adequados – formando gotículas de coacervado, correspondendo a um sistema de três fases; (c) as gotículas de coacervado adsorvem-se à substância dispersa como consequência da tensão superficial extremamente baixa da água residual ou solvente no material de revestimento, formando gradualmente um envoltório em fase líquida, o que garante um revestimento uniforme do núcleo; (d) promove-se a solidificação do coacervado formado pelo método oportuno – podem ser citadas como exemplo a gelificação, a retificação química ou polimerização do envoltório líquido. As microcápsulas produzidas são retiradas do sistema por centrifugação ou filtração e sofrem posterior secagem (GUEDAS, 1981; ANSEL, ALLEN JR, POPOVICH, 1999).

A coacervação representa um fenômeno de descarga, no qual as partículas não são desidratadas totalmente: enquanto as partículas desidratadas apresentam carga elétrica, na coacervação elas perdem a sua carga, mas continuam hidratadas. Por este mecanismo, as partículas aproximam-se muito umas às outras e, sob certas circunstâncias, uma partícula perde sua camada de solvatação. É produzido um coacervado rico em colóides com partículas densamente unidas, no qual as camadas de solvente de solvatação mantém o estado de agregação fluida (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MICROENCAPSULAMENTO POR COACERVAÇÃO



a) o núcleo é disperso em solução coloidal do material de revestimento

b) sistema de três fases após formarem-se gotículas de coacervado

c) revestimento do núcleo por gotículas de coacervado

d) solidificação do coacervado

FONTE: GUEDAS, 1981

Nos fenômenos de coacervação apresentam importância decisiva a concentração, a temperatura, o pH, a adição de eletrólitos, a viscosidade e a tensão superficial (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982).

2.4.3 Caracterização de Micropartículas

As micropartículas obtidas devem ser caracterizadas e controladas de acordo com ensaios que assegurem sua qualidade e homogeneidade, assim como seu comportamento biofarmacêutico. Tais ensaios incluem: características morfológicas como estrutura interna e tamanho da partícula, rendimento da produção, eficácia de encapsulamento e conteúdo de fármaco, estudo de liberação do fármaco, estado físico e interações polímero-fármaco (JATO, 1997).

As micropartículas podem constituir por si mesmas uma forma farmacêutica ou podem ser acondicionadas em uma forma farmacêutica secundária. Desse modo, as micropartículas podem ser administradas sob a forma de suspensão ou incluídas em uma cápsula ou comprimido. A forma farmacêutica final estará condicionada para a via de administração do produto microencapsulado. Nesse contexto, é importante ressaltar que a maioria das micropartículas presentes atualmente no mercado são destinadas à administração por via oral, contudo, existem microcápsulas administráveis por uma via parenteral (intramuscular ou subcutânea) (JATO, 1997).

2.5 A ABSORÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FRENTE AO MICROENCAPSULAMENTO

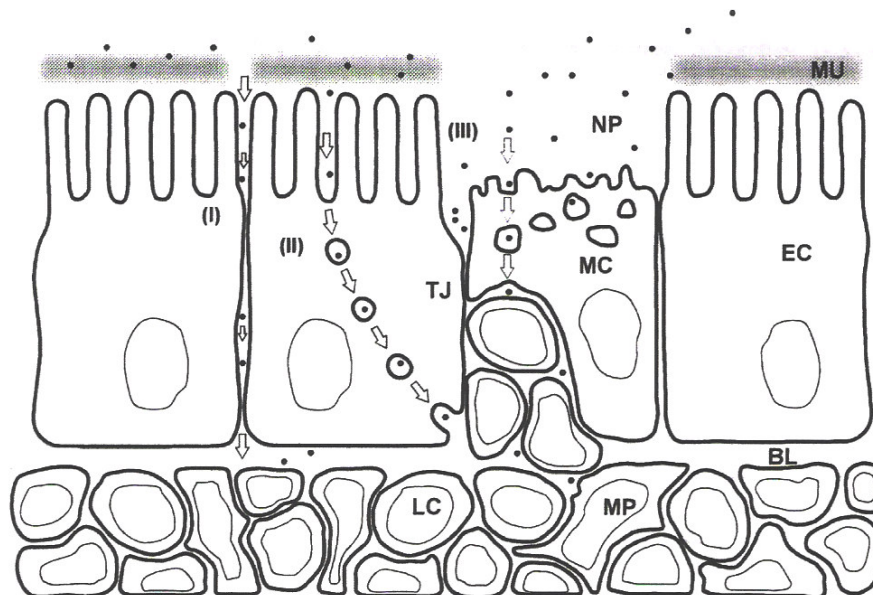
O aumento ou modulação da liberação e absorção de fármacos é amplamente reportado frente ao seu microencapsulamento. Uma das vantagens deste processo é que a dose administrada de um fármaco é subdividida em pequenas unidades que são dispersas por uma ampla área do trato gastrointestinal, o que pode aumentar a absorção por redução da concentração localizada de fármaco (ANSEL, ALLEN JR, POPOVICH, 1999).

No entanto, deve-se considerar que uma vez que os materiais que compõem as micropartículas são absorvidos pelo organismo, requerimentos adicionais devem ser considerados, como biocompatibilidade e biodegradabilidade (JUNG *et al.*, 2000). As micropartículas com matriz de revestimento constituída por polímeros artificiais apresentam freqüentemente citotoxicidade depois da internalização celular (WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

Após absorvidos, a liberação do fármaco contido nas micropartículas pode ocorrer por mecanismos de erosão (dissolução da matriz de revestimento ou degradação enzimática), ou por difusão através da matriz. O grau de liberação pode ser controlado pela natureza do material de revestimento, pelo tamanho e área de superfície da partícula, pela localização do fármaco dentro da micropartícula (dependente da interação fármaco-componente do revestimento), ou pelo surfactante utilizado para a estabilização da camada de revestimento (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).

JUNG e colaboradores (2000) reportam que a absorção endógena via oral pode ser realizada por vários mecanismos no trato gastrointestinal, incluindo a absorção paracelular (realizada por polímeros como quitosana, poliacrilato ou amido, que se ligam ao epitélio por meio de suas cargas), absorção endocítica por meio da internalização das partículas, ou por meio de mecanismos imunológicos de cooperação altamente especializados, conforme representado na figura 7.

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE ABSORÇÃO INTESTINAL DE NANOPARTÍCULAS



Muco (MU) sobre enterócitos absorptivos (EC) e células caliciformes (MC) no intestino delgado. Linfócitos (LC) e macrófagos (MP) do tecido linfóide vicinal podem atravessar a lâmina basal (BL) e atingir a camada de células epiteliais que é selada por junções de oclusão *tight junctions* (TJ). As rotas de translocação possíveis para as nanopartículas (NP) são (I) absorção paracelular, (II) absorção endocítica e (III) através de células caliciformes.

FONTE: JUNG *et al.*, 2000.

GASPAR (1991) verificou, ao estudar nanopartículas de poliisocianoacrilato contendo primaquina frente a cepas de formas amastigotas do parasito *Leishmania donovani*, a liberação rápida do fármaco com redução da sua toxicidade aguda frente a hepatócitos, e com aumento de 21 vezes na eficácia da atividade leishmanicida *in vitro*.

MÜHLEN e colaboradores (1998) verificaram a possibilidade de liberação prolongada de nanopartículas de lipídeos sólidos, utilizando tetracaína, etomidato e prednisolona como modelos de fármacos e trilaurato de glicerol, berrenato de glicerol e colesterol como componentes lipídicos de revestimento. As nanopartículas com revestimento de trilaurato e berrenato de glicerol apresentaram liberação imediata com todos os fármacos testados, reportada à ampla área de superfície, baixa viscosidade da matriz, alto coeficiente de difusão devido à baixa distância de difusão provocada pela incorporação do fármaco sobre a matriz. No entanto, os testes envolvendo colesterol e prednisolona resultaram em liberação prolongada, demonstrando que formulações com tal característica são possíveis utilizando-se de

nanopartículas de lipídeos sólidos e fármacos de natureza lipofílica, se o parâmetro de grande diferença entre os pontos de fusão do fármaco e da matriz for respeitado, pois desta forma há diferenciação na deposição da substância ativa dentro da partícula. O alto grau de interação molecular entre o lipídeo e o fármaco também é significativo para a liberação controlada, pois dessa forma a transição polimórfica para a forma cristalina mais estável do lipídeo de revestimento é retardada.

Na busca de vetores farmacêuticos capazes de reconhecer o órgão-alvo para uma ação mais eficaz do fármaco, estudos relatam a introdução de proteínas ou polímeros capazes de serem reconhecidos por células do sistema imunológico na composição da matriz de revestimento. Os vetores coloidais são removidos rapidamente pelo sistema reticuloendotelial devido à ligação facilitada das partículas com as células fagocíticas (MATSUMOTO *et al.*, 1999).

Neste contexto, ULTREJA e colaboradores (1999) desenvolveram sistemas de biovetorização mimetizantes de lipoproteínas, com a finalidade de veicular agentes citotóxicos até células tumorais sem que fossem capturados pelo sistema reticuloendotelial devido à semelhança dos componentes de revestimento com os do organismo, e utilizaram o metotrexato como modelo de fármaco e p-PEG 4000 (palmitoil - polietilenoglicol 4000) revestindo a partícula como análogo de apoproteína, obtendo resultados promissores. MATSUMOTO e colaboradores (1999) desenvolveram nanopartículas com revestimento polimérico menos passível de captura pelo sistema reticuloendotelial (poli[lactideo-co-glicolídeo]-poli[etilenoglicol] (PLGA-PEG), poli[L-lactídeo]-poli[etilenoglicol] (PLA-PEG), poli[L-lactídeo]-poli[etilenoglicol]- poli[L-lactídeo] (PLA-PEG-PLA)), visto que copolímeros constituídos por dois ou mais tipos de polímeros diferentes são capazes de reduzir a adsorção de proteínas pela formação de uma camada hidrofílica e uma carga superficial baixa originária do polietilenoglicol.

A pele tem sido usada por séculos como sítio de administração para fármacos de tratamento local, mas apenas recentemente tem sido usada como via para efeitos sistêmicos. Nesse caso, a absorção do fármaco é dependente da área de superfície cutânea sobre a qual o fármaco é aplicado e à sua lipossolubilidade, visto que a epiderme comporta-se como barreira lipídica. No entanto, a derme é livremente permeável a muitos solutos (GOODMAN-GILMAN, 1996).

Para a utilização de via de administração percutânea, considera-se que a epiderme, camada mais externa da pele, é constituída por três camadas principais, o estrato córneo (*stratum corneum*), a camada granular, e a camada basal. A composição lipídica entre elas é muito diferenciada, sendo esse o motivo pelo qual o estrato córneo representa a barreira principal para a absorção percutânea: sendo composto por células mortas e inviabilizadas de absorver substâncias através da membrana, a sua constituição é definida principalmente por ceramida (50%) e ácidos graxos (25%), sendo que os fosfolipídeos polares são ausentes (MARTIN, BUSTAMANTE, CHUN, 1993; SCHAEFER, REDELMEIER, 1996; AULTON, 2005)

O desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos viáveis representa um desafio para a ciência farmacêutica, especialmente porque a biodisponibilidade é limitada pelas barreiras epiteliais das vias de administração (JUNG *et al.*, 2000). Com o intuito de permitir a facilitação da absorção dos fármacos por diversas vias, especialmente a percutânea, e de modular a liberação dos mesmos através das células, são utilizados vetores farmacêuticos (CHIEN, 1991; HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999).

2.6 A ESTABILIDADE DE SUBSTÂNCIAS FRENTE AO MICROENCAPSULAMENTO

A alteração da estabilidade da substância frente ao seu microencapsulamento é bastante reportada, e pode ser explicada pela formação de barreira física composta pelo material de revestimento, capaz de impedir a atuação direta de agentes desestabilizantes contra o fármaco.

SCHAFFAZICK e colaboradores (2003) citam que a promoção da estabilidade de suspensões de nanopartículas para atingir um tempo de meia vida maior do fármaco tem recebido atenção considerável, representando um campo importante na pesquisa de vetores de fármacos.

JUNG e colaboradores (2000) afirmam que as micropartículas promovem um encapsulamento dos fármacos dentro de uma matriz polimérica, protegendo-as contra degradação enzimática e hidrolítica.

No entanto, a utilização de diferentes materiais de revestimento resulta em propriedades finais da preparação diferentes. SANTOS e colaboradores (2000) testaram as propriedades de estabilidade contra oxidação de micropartículas de óleo de páprica, e determinaram que as microcápsulas de goma arábica são mais estáveis frente à luz e à temperatura do que as de amido e gelatina.

WISSING e colaboradores (2004) reportam que a estabilidade física de dispersões aquosas de nanopartículas de lipídeos sólidos (SLN) é geralmente superior a um ano, porém a exposição do sistema a fatores energéticos (luz, temperatura) pode induzir a um crescimento das partículas e redução da sua estabilidade. A correlação da estabilidade física da preparação com o estado polimórfico do lipídeo é também explicada, pois após a produção das SLN estão presentes as formas polimórficas β' , α e sub α dos lipídeos, e a absorção de energia cinética promove a transformação para a forma polimórfica mais estável β' acompanhada pela formação de gel, demonstra-se também que o armazenamento sob resfriamento e livre de luz inibe tal transformação.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL

Frutos maduros da espécie vegetal *Musa paradisiaca* foram coletados no período compreendido entre os meses de março e maio de 2006 (o que climaticamente corresponde ao período de chuvas inicial de outono), durante a fase biológica de frutificação do vegetal. Geograficamente, são provenientes de área cultivada no município de Morretes/PR (latitude S 25° 28' 37", longitude Wg 48° 50' 04", altitude 8,48m). A exsicata analisada pelo botânico Dr. Gerdt Hatchbach foi identificada como da espécie vegetal *Musa paradisiaca* var *sapientum* (L.) Kuntze, Musaceae e registrada sob o número 170.601 no Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba/PR.

O material coletado foi descascado, e as cascas submetidas a fragmentação mecânica com lâminas em moinho de facas. Em seguida, procedeu-se a estabilização por secagem em estufa a 50°C provida de circulação de ar.

3.2 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL

Durante a secagem do material, foi determinado também o teor de umidade, e posteriormente, o teor de cinzas totais. A determinação de umidade e a de cinzas totais justifica-se pela verificação de parâmetros de qualidade da amostra obtida.

Posteriormente, foi realizado o ensaio sistemático de análise fitoquímica, para determinar qualitativamente os grupos químicos presentes na amostra vegetal.

3.2.1 Determinação de Umidade

A quantidade excessiva de água em material vegetal propicia desenvolvimento de insetos, microorganismos e hidrólise, resultando em deterioração do material vegetal e de seus constituintes (FARMACOPÉIA, 1988).

Para a determinação de umidade nas cascas de frutos de *Musa paradisiaca*, empregou-se método gravimétrico adaptado daquele descrito na FARMACOPÉIA (1988), submetendo massa determinada de material vegetal a aquecimento em estufa a 50°C durante quarenta e oito horas, e após resfriamento até temperatura ambiente em dessecador, procedendo a pesagem do mesmo. O material é devolvido à estufa e o processo de resfriamento e pesagem é repetido sucessivamente até o

resultado de duas pesagens não diferir por mais de 5mg. O resultado é apresentado em porcentagem de água em relação ao material vegetal original.

3.2.2 Determinação de Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais tem por finalidade estabelecer a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração (FARMACOPÉIA, 1988).

Para a determinação de cinzas totais presentes nas cascas de frutos maduros de *Musa paradisiaca*, empregou-se o método gravimétrico descrito na FARMACOPÉIA (1988), no qual se pesa o material vegetal contido em cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado, e incinera-se o material em mufla Elektro® modelo High Therm Linn até eliminação do carvão, não ultrapassando a temperatura de 800°C. Resfria-se até temperatura ambiente em dessecador, e então procede-se a pesagem do resíduo presente. O resultado é obtido por porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original.

3.2.3 Estudo Fitoquímico

Visando a identificação dos principais grupos químicos presentes nas cascas de frutos de *Musa paradisiaca*, procedeu-se inicialmente o ensaio sistemático de análise fitoquímica utilizando metodologias descritas por MOREIRA (1979), MATOS e MATOS (1989) e MIGUEL (2003) com algumas adaptações.

A investigação preliminar de constituintes químicos representa, muitas vezes, um estímulo motivador da curiosidade, já que possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica a natureza das substâncias presentes, facilitando a escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico. As principais classes de constituintes químicos de plantas que podem ser detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides; quais são metabólitos secundários vegetais, assim chamados os produtos naturais (MACIEL, PINTO, VEIGA JR, 2002; CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

3.2.3.1 Extrato etanólico

O extrato etanólico foi preparado por processo de maceração a quente em banho-maria Biomatic® 1062/822 a 70°C por uma hora, utilizando 30g de material

vegetal e 200mL de etanol 70% (líquido extrator). Decorrida uma hora, o frasco é retirado do banho-maria, o extrato é filtrado e o volume completado até 200mL com o líquido extrator.

O extrato etanólico é concentrado até adquirir 1/3 de seu volume com o intuito de eliminar o excesso de etanol. Em seguida realiza-se fracionamento com hexano, diclorometano e acetato de etila, solventes em ordem crescente de polaridade, com auxílio de um funil de separação. O extrato concentrado (60mL) é colocado em funil de separação com 25mL do respectivo solvente, agitando-se com freqüente alívio da pressão interna, e após 5 minutos de repouso, são retiradas as frações visualmente separadas. Este processo é repetido por quatro vezes, unindo-se as frações orgânicas. São obtidas assim a fração hexano, a fração diclorometano, a fração acetato de etila e a fração hidroalcóolica, completando o volume das frações para 200mL com os respectivos solventes, quando necessário.

Estas frações foram utilizadas para pesquisa de alcalóides, leucoantocianidinas, flavonóides, cumarinas, antraquinonas, esteróides e triterpenos.

3.2.3.1.1 Pesquisa de alcalóides

Os alcalóides são compostos de caráter básico e sua solubilidade modifica em função do pH em diferentes solventes. Os alcalóides na forma básica são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em solventes aquosos; na forma de sal, são solúveis em solventes aquosos e insolúveis em solventes orgânicos.

Esta pesquisa fundamenta-se na capacidade que os alcalóides possuem, em estado de sal, de combinar-se com iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio e tungstênio e formarem precipitados.

Para realização deste ensaio, 25mL de cada fração obtida pelo processo descrito anteriormente (3.2.3.1) são depositados em cápsula de porcelana e levados à secura em banho-maria a 50°C. O resíduo é dissolvido em 1mL de etanol e são acrescentados 20mL de ácido clorídrico a 1%. A solução clorídrica de cada extrato é transferida para tubos de ensaio, no volume de 1 mL por tubo, para proceder a pesquisa para alcalóides com a adição de 2 gotas dos seguintes reativos: (a) reativo de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), cuja reação positiva é observada por formação de precipitado branco ou leve turvação branca; (b) reativo de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) cuja reação positiva é observada por formação de

precipitado de coloração tijolo; (c) reativo de Bouchardat cuja reação positiva é observada por formação de precipitado de coloração alaranjado; e (d) reativo de Bertrand (ácido sílico túngstico) cuja reação positiva é observada por formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Ocorrendo reação positiva, a confirmação é realizada pela transferência do restante do extrato clorídrico para um funil de separação, alcalinizando-se com hidróxido de amônio até pH 9 a 10 e extraíndo-se três vezes com 15 mL de uma solução de diclorometano e éter na proporção 3:1. Os extratos de éter diclorometano são reunidos, levados à secura em banho-maria, adicionados 0,5mL de etanol e 5mL de ácido clorídrico a 1%, e após leve aquecimento, resfriados e divididos em tubos de ensaio. Procede-se novamente a pesquisa de alcalóides com os reativos descritos anteriormente. Havendo formação de precipitado, a reação confirma-se com 2 mL de solução alcoólica de ácido tartárico 5% e dissolução do complexo formado.

3.2.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são consideradas flavonóides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Esta pesquisa explica-se com a reação de redução da leucoantocianidina (de coloração amarela) em antocianidina (de coloração vermelha) em presença de ácido clorídrico.

A pesquisa de leucoantocianidinas ocorre submetendo-se 5mL das frações em cápsula de porcelana à secura em banho-maria (50°C) e recuperação com 5 mL de etanol, 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecimento até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

3.2.3.1.3 Pesquisa de flavonóides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonóide em presença de ácido. São colocados em cápsula de porcelana 5mL das frações hexano, diclorometano e acetato de etila, levando à secura em banho-maria (50°C) e adicionando-se 5mL de etanol, e em seguida transferindo-as para tubos de ensaio. A fração hidroalcoólica não é levada à secura, apenas transferida diretamente (5mL) para um tubo de ensaio.

Os tubos de ensaio são colocados em copo de béquer com gelo, dentro da capela. A cada tubo de ensaio é adicionada uma pastilha de zinco, e lentamente, ácido clorídrico fumegante com ocorrência de reação exotérmica. A reação positiva para flavonóides desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavona com coloração amarela a vermelha; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelha a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelha a violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa; e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

3.2.3.1.3.1 Reação de Taubock ou teste do oxálico-bórico

São colocados em cápsula de porcelana 10mL de cada fração e levada à secura em banho-maria. Aos resíduos são adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitando-se e levando-se novamente   secura. A cada novo resíduo, 5mL de éter etílico são adicionados, e são transferidos para respectivos tubos de ensaio para verificação de fluorescência sob luz ultravioleta de ondas longas. Esta reação é explicada pela formação de quelatos, produzindo deslocamento batocrômico da banda I dos derivados do ácido borônico (compostos obtidos do ácido bórico com substituições na molécula por dois radicais orgânicos). A reação oxalo-b rica determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis; flavanonas e isoflavonas não apresentam fluorescência; enquanto os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

3.2.3.1.4 Pesquisa de cumarinas

Esta pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxicinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e conseqüente formação do ácido hidroxicinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma *cis* migra para forma *trans*, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

A fração hidroalcoólica, acidificada com ácido clorídrico até pH 1,0, é submetida à redução de volume de 15mL a 5mL em banho-maria, e após resfriada, extraída com duas vezes de 10mL de éter etílico, com auxílio de funil de separação. As

frações etílicas adquiridas com as duas extrações são reunidas e concentradas em banho-maria (50°C) até 5mL.

As frações hexano, diclorometano e acetato de etila, são adicionadas em volume de 15mL em cápsula de porcelana e levadas ao banho-maria a 50°C até secura, e após resfriamento, recuperadas em 5mL de éter etílico.

Cada extrato etéreo é transferido em 3mL para tubos de ensaio, adicionando-se 2mL de hidróxido de sódio 1N, e os tubos são levados à câmara de luz ultravioleta Chromato-VUE em 365nm e deixados em exposição por 15 minutos. Para reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

As gotas residuais dos extratos etéreos são depositadas em papel de filtro em três pontos previamente marcados com grafite, concentrando-os de modo a obter manchas com aproximadamente 1cm de diâmetro. As duas primeiras manchas são tratadas com uma gota de hidróxido de sódio 1N, a primeira mancha é coberta com uma moeda, a fim de se fazer um controle negativo, e o papel de filtro é levado à câmara de ultravioleta a 365nm, deixando-o em exposição por 15 minutos. Ocorrendo reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada na segunda mancha.

3.2.3.1.5 Pesquisa de antraquinonas

Cada fração é tomada em volume de 15mL e transferida para um balão de fundo chato com 250mL de capacidade, juntamente a 5mL de solução aquosa a 10% de ácido sulfúrico. O balão é acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo por trinta minutos. Decorrido este tempo, o balão é retirado e o extrato sulfúrico é filtrado ainda quente. Ao filtrado são adicionados 30mL de água destilada para então ser transferido a um funil de separação e extraído duas vezes com 10mL de éter etílico. Os extratos etéreos são reunidos e concentrados a 5 mL.

Os extratos etéreos são então colocados em tubos de ensaio para efetuar a reação de Borntraeger ao adicionar 5mL de hidróxido de amônio e agitar lentamente. A reação positiva observa-se ao aparecimento de coloração vermelha devido à ionização das hidroxilas fenólicas.

3.2.3.1.6 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos

Cada fração é tomada em volume de 15mL em cápsulas de porcelana, evaporada à secura e recuperada com 5mL de clorofórmio, para em seguida ser submetida à filtração.

Volumes de 1mL, 0,2mL e 0,1mL de cada extrato clorofórmico são pipetadas para tubos de ensaio e o volume é completado para 2mL com clorofórmio. A reação de Liberman-Bouchard é efetuada adicionando-se 1mL de anidrido acético e 2mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente. A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito; coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito; coloração amarela indica possível presença de metila no carbono número catorze (quadro 5).

3.2.3.2 Extrato aquoso

O extrato aquoso é preparado por processo de maceração a quente em banho-maria Biomatic® 1062/822 a 70°C por uma hora, utilizando 30g de material vegetal e 180mL de água destilada (líquido extrator). Decorrida uma hora, retira-se o frasco do banho-maria, o extrato é filtrado e o volume completado até 150mL com o líquido extrator, lavando o material.

Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

3.2.3.2.1 Pesquisa de antocianinas

As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquire coloração azul devido à estrutura quinóide.

Para a realização deste ensaio, transfere-se 5mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidifica-se o primeiro tubo com ácido clorídrico 1% até pH aproximadamente 4,0; alcaliniza-se o segundo tubo com hidróxido de amônio até pH aproximadamente 10,0; e neutraliza-se o terceiro tubo em pH 7,0.

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violácea em meio neutro, indica reação positiva.

3.2.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Agitam-se energeticamente com movimentos succionais por cinco minutos os tubos da pesquisa de antocianinas, deixando-os em repouso por trinta minutos. Mede-se a altura do anel de espuma formado logo após agitação e decorridos trinta minutos. A reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

3.2.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas (β -glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997).

Para este ensaio utiliza-se a reação do isopurpurato de sódio, que ocorre na transferência para um tubo de ensaio de 5mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), adição de 1mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspensão de uma tira de papel picro-sódico no tubo e encaminhamento a banho-maria por trinta minutos à 60°C.

Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada no papel picro-sódico.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

3.2.3.2.4 Pesquisa de taninos

Os taninos são divididos em duas classes, considerando os núcleos fenólicos existentes e na união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997).

Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas. A maioria dos taninos condensados, são resultantes da condensação de dois flavan-3-óis ou mais (catequina) ou de flavan-3,4-dióis (leucocianidina) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Para a pesquisa de taninos os seguintes reagentes foram utilizados:

3.2.3.2.4.1 Cloreto férrico

São adicionadas três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonóides e coloração marrom indica polifenóis.

3.2.3.2.4.2 Solução de gelatina

São transferidos respectivamente 0,5mL, 1,0mL e 2,0mL de extrato aquoso para tubos de ensaio e então adiciona-se 2mL de solução aquosa de gelatina a 2,5%. Desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

3.2.3.2.4.3 Cloridrato de emetina

São adicionados 4mL de água destilada e duas gotas de solução aquosa de emetina 1% a 1mL de extrato aquoso. Desenvolvimento de precipitado indica reação positiva.

3.2.3.2.4.4 Formol clorídrico ou ensaio de Staniasny

São transferidos 30mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250mL de capacidade e são adicionados 6mL de formaldeído 40% e 4mL de ácido clorídrico 37%. O balão é acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, é resfriado e o extrato formol-clorídrico é submetido a filtração, reservando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. O resíduo da filtração é lavado com uma solução de etanol 50%, gotejando sobre o

resíduo da lavagem gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio.

Utilizando-se o filtrado reservado, excesso de acetato de sódio é adicionado sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Reação positiva para taninos hidrolisáveis visualiza-se com desenvolvimento de coloração azul vicinal aos grumos de acetato de sódio, ao adicionar o cloreto férrico.

3.2.3.2.5 Pesquisa de aminogrupos

Em cápsula de porcelana e com auxílio de um banho-maria à temperatura de 60°C, o volume de 10mL de extrato aquoso é concentrado até 5 mL. Em tira de papel de filtro, são adicionadas cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, o papel de filtro é nebulizado com solução de ninhidrina e levado à estufa à temperatura de 95-100°C, durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

3.2.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

O volume de 20mL de extrato aquoso e 2mL de hidróxido de sódio 1N são transferidos para balão de fundo chato com 100mL de capacidade, que é acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, resfria-se e acidifica-se o extrato alcalino com solução de ácido sulfúrico 1N. Procede-se extração, com auxílio de um funil de separação, com 10mL de éter etílico por três vezes. Os extratos etéreos são reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. O resíduo é aquecido em estufa a 100°C por dez minutos, resfriado, e 5mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N é adicionado para posteriormente ser filtrado. Três gotas do filtrado são adicionados a um papel de filtro, obtendo-se uma mancha com aproximadamente 1cm de diâmetro. Sobre a mancha, é gotejado reagente de Nessler. Para controle negativo utiliza-se uma mancha com o reativo de Nessler. O papel de filtro é levado à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom.

3.2.3.2.7 Pesquisa de ácidos voláteis

O volume de 10mL de extrato aquoso é acidificado com solução de ácido sulfúrico 1N até pH de aproximadamente 1,0. O extrato ácido é colocado em tubo de ensaio e levado à fervura, para se determinar o pH dos vapores com auxílio de uma fita indicadora de pH suspensa, presa ao tubo com rolha de cortiça. O aparecimento de pH abaixo de sete indica presença de ácidos voláteis.

3.3 EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL A PARTIR DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA

Para a extração do estigmasterol a partir de cascas de frutos de *Musa paradisiaca*, partiu-se de um total de 255kg de frutos frescos, obtendo-se massa de 92,10kg de cascas frescas, e como amostra vegetal 10,43kg de cascas secas e estabilizadas.

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para uma posterior purificação. A escolha do solvente para extração deve ser feita tendo em vista os objetivos do estudo e os resultados da abordagem fitoquímica. Geralmente se usam solventes polares como etanol ou metanol para fazer a extração e posteriormente promove-se a separação dos compostos (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003). Portanto, a amostra vegetal foi submetida à extração exaustiva com etanol por percolação contínua em soxhlet, sob aquecimento com manta Fisatom® modelo 302, a 80°C por 4 a 6 horas. O extrato etanólico obtido foi então concentrado por agitação a quente a pressão reduzida com rotavapor Heidolph® Laborota 4000 OB, a temperatura de 40°C e rotação de 90 rpm. Posteriormente promove-se partição líquido-líquido com hexano (Synth®), em aparelho de soxhlet modificado segundo CARVALHO (2001), sob as mesmas condições de tempo e temperatura. O extrato hexânico resultante, após concentração por agitação a quente a pressão reduzida, é submetido a separação em cromatografia em coluna conforme descrito a seguir.

3.3.1. Cromatografia em Coluna

Uma vez extraído da planta, o composto bioativo deve ser separado do extrato bruto. O procedimento pode envolver desde uma simples cristalização do composto até separações sucessivas com partições em solventes de polaridades diferentes e extensivas técnicas cromatográficas. A cromatografia é um método físico de separação, na qual os compostos a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase fixa de grande área superficial, denominada estacionária, e outra, um fluido que percola através dela, denominada fase móvel. Para a separação de compostos em larga escala, um método clássico e amplamente utilizado é a Cromatografia em Coluna (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

A cromatografia em coluna é realizada com o objetivo de separar os compostos presentes na fração hexânica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (tamanho da partícula 70-230 mesh ASTM) e como fase móvel sistemas de solventes com polaridade aumentada gradualmente, consistindo em hexano, diclorometano e clorofórmio. O sistema sólido que constitui a fase estacionária é formado por pastilha de sílica-gel 60 com a referida fração adsorvida (na proporção de 5 partes em relação à quantidade de amostra, submetida a prévia secagem em banho-maria a 60°C sob constante homogeneização) sobrepondo uma camada de sílica-gel 60 em proporção 3 vezes maior, sendo limitadas por papel de filtro.

A fase estacionária é submetida à eluição com fase móvel por meio de aparelho de soxhlet modificado de modo a promover partição sólido-líquido segundo OLIVEIRA, MIGUEL e MIGUEL (2007), resultando em frações de eluato de volume variável, visualmente diferenciadas entre si e avaliadas por cromatografia em camada delgada comparando-se com padrão de estigmasterol, conforme descrito abaixo (3.2.2). As frações obtidas sofrem concentração por agitação a quente e a pressão reduzida até evaporação total do solvente, e aquelas cuja cromatografia em camada delgada acusa a presença de estigmasterol são submetidas à cristalização da substância conforme descrito a seguir (3.2.3).

3.3.2 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada por sua vez, foi realizada em placas cromatográficas com sílica-gel Merck®, com dimensões 5 cm de altura por 2,5 cm de largura, e eluídas com fase móvel tolueno : acetato de etila (93:7) em cuba previamente saturada por 10 minutos.

Após a aplicação dos pontos de amostras e de padrão, a placa é inserida na cuba e submetida à eluição com a fase móvel. O processo de revelação ocorre borrifando vanilina sulfúrica (STAHL, 1969) sobre a placa eluída com posterior aquecimento até o aparecimento de manchas violáceas quais terão o R_f (fator de relação) calculados.

3.3.3. Cristalização do Estigmasterol a Partir do Eluato da Coluna Cromatográfica

O conteúdo sólido resultante das frações onde o estigmasterol está presente, de acordo com os resultados obtidos pela cromatografia em camada delgada, é

solubilizado em éter de petróleo leve (30-60°C) (Merck®) sob aquecimento a 40°C, e submetido a resfriamento repentino a 0°C por 5h para a cristalização da substância. O sistema foi então filtrado a vácuo utilizando-se de éter de petróleo a 5°C e filtro sinterizado classificação G3, e o resíduo coletado por solubilização com clorofórmio.

Após a evaporação do clorofórmio, promove-se purificação do material por recristalização com acetona e resfriamento a 0°C por 8h, seguida de nova filtração a vácuo utilizando-se de filtro sinterizado classificação G3, obtendo-se desta forma o estigmasterol purificado. Obtém-se um grau de pureza maior após a segunda recristalização com n-pentanol aquecido a 60°C seguido de resfriamento até temperatura ambiente protegido da luz, obtendo-se cristais precipitados de estigmasterol (XU *et al.*, 2005).

3.3.4. Confirmação da Pureza da Substância Extraída

Tendo em vista que o método de detecção de substâncias na cromatografia em camada delgada não possibilita a verificação de estruturas de propriedades variadas, faz-se necessária a utilização de outros métodos para a verificação de impurezas com características menos específicas.

Para tanto, as amostras tidas como puras pela cromatografia em camada delgada foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa. A confirmação da identidade do composto obtido foi realizada através de análise espectrométrica com radiação infravermelha (IVTF).

3.3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência envolve a caracterização, detecção e subsequente separação, bem como controle final da pureza do composto isolado. Quando acoplada a detector de radiação ultra-violeta (UV), fornece informações a respeito do tipo de constituintes, ou sobre oxidações dos compostos (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® modelo LC10AD equipado com detector de absorção na faixa do UV/vis com comprimento de onda variável modelo SPD10A e válvula de injeção Rheodyne® com alça de injeção de 100 µL. A análise foi promovida em uma coluna de fase reversa RP-18 (Thermo Hypersil, ODS, 4,6mm x 150mm, 5 µm) a temperatura de 30°C, utilizando como fase

móvel isocrática metanol – acetonitrila na proporção 30 : 70 (v/v) (solventes grau de pureza cromatográfico marca Actual Analysis – J. T. Barker) sob vazão de 0,9 mL por minuto, volume de injeção 20 μ L e detecção a 205 nm. Os dados foram analisados pelo sistema Real Time Analysis, fornecido pelo fabricante do equipamento.

3.3.4.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é um método usado para separar os componentes de uma solução e determinar a sua quantidade relativa. Também pode ser avaliada a pureza da amostra. Quando acoplada a espectrometria de massas torna-se muito sensível na identificação de compostos (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

Utilizou-se o cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massa (GC/MS) Shimatzu® modelo QP5050A equipado com coluna megabore DB-5, aplicando como gás de arraste o hélio com vazão de 1 mL por minuto, como isoterma de temperatura a 230°C; sendo a mesma temperatura condicionada ao injetor e ao detector, e como volume de injeção 1 μ L.

3.3.4.3 Espectrometria sob radiação infravermelha

A confirmação da identidade química do esteróide foi desenvolvida por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), empregando-se 2mg da amostra e 198mg de brometo de potássio grau de pureza espectroscópico (1% em massa), comprimido com força de 8 toneladas. As leituras foram feitas no equipamento Excalibur Series FTS 3500GX, Bio-Rad Laboratories, 32 scans/min, resolução de 2 cm^{-1} , comprimento de onda na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.4 MICROENCAPSULAMENTO DO ESTIGMASTEROL

As micropartículas de natureza protéica serão elaboradas a partir de gelatina por processo de coacervação simples conforme descrito por JATO (1997), e aquelas de natureza lipídica a partir de ácido esteárico por processo de polimerização de microemulsão descrito por CAVALLI *et al.* (1999), sendo previamente validados ambos os processos de elaboração utilizados pelo seu procedimento exaustivo utilizando progesterona e estigmasterol como fármacos, além daquele sem fármaco.

3.4.1 Produção de Micropartículas com Revestimento de Gelatina

As referidas micropartículas são produzidas pelo processo de coacervação simples. A uma solução de gelatina (Farmanilquima, Curitiba - PR) a 10% aquecida a 50°C, adiciona-se etanol no qual está dissolvido o estigmasterol, na proporção de 50% para a formação de coacervado, sob agitação magnética em equipamento marca Jouam® por 15 minutos à velocidade de 45 rotações por minuto, e posteriormente ultrasônica por 45 minutos à mesma temperatura. Promove-se então resfriamento até 10°C para a gelificação, seguida de lavagem com água e filtração em papel de filtro com abertura de poro de 6 µm. Ao filtrado, que consiste em uma suspensão, é adicionada solução de formaldeído (Synth®, Diadema - SP) a 25% para o endurecimento das micropartículas por meio de reação de ligação cruzada entre o aldeído e a gelatina (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982). Tal procedimento justifica-se pelo fato que a grande limitação do uso de gelatina para a preparação de sistemas vetores de fármacos compreende na sua rápida dissolução em meios aquosos à temperatura corpórea. Portanto, a utilização de tratamentos que promovam ligação química cruzada (glutaraldeído ou formaldeído) forma redes não solúveis na superfície das micropartículas (CORTESI, NASTRUZZI, DAVIS, 1998).

Promove-se nova filtração em funil de vidro sinterizado classificação G4 para a eliminação de formaldeído e de estigmasterol não encapsulado dissolvidos. O resíduo obtido consiste nas micropartículas, que podem ser submetidas a liofilização (para a observação em microscopia eletrônica (3.5.3)) ou re-suspensão em água purificada (para os testes de estabilidade (3.5.5) e absortividade (3.5.4)). O filtrado obtido apresenta-se límpido e é submetido a doseamento conforme descrito a seguir (3.5.2).

3.4.2 Produção de Micropartículas com Revestimento de Ácido Esteárico

Dissolve-se o estigmasterol na proporção 0,5% em ácido esteárico (0,70 mmol, Synth®, Diadema - SP) aquecido a 70°C em banho-maria Biomatic® 1062/822, e adiciona-se solução aquosa de fosfatidilcolina de soja (0,17mmol, ViaFarma®, São Paulo) e monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO (0,25mmol, Tween 80, Synth®, Diadema - SP) à mesma temperatura, sob agitação mecânica, obtendo-se uma microemulsão clara que é vertida a 70°C sobre água fria (2-3°C) na proporção 1:10 v/v, sob agitação magnética em equipamento marca Jouam® por 15 minutos à velocidade de 45 rotações por minuto. Posteriormente procede-se lavagem com água e filtração em papel de filtro com abertura de poro de 6 µm, seguida por nova filtração em funil de vidro sinterizado classificação G4 para a eliminação de fármaco não encapsulado em solução. O resíduo obtido consiste nas micropartículas, que podem ser submetidas a liofilização (para a observação em microscopia eletrônica (3.5.3)) ou re-suspensão em água purificada (para os testes de estabilidade (3.5.5) e absorvidade (3.5.4)). O filtrado obtido apresenta-se límpido e é submetido a doseamento conforme descrito a seguir (3.5.2).

3.5 AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

A avaliação analítica das micropartículas foi realizada mediante amostragem probabilística estratificada para que os resultados obtidos sejam expressivos de todo o material produzido, e mediante testes em duplicata ou triplicata, frente a controles positivos e negativos quando possível, para a obtenção resultados fidedignos. Os dados foram coletados por instrumentos de investigação consistentes em gráficos, imagens, quadros e tabelas comparativas construídos para a demonstração de elementos da parte experimental e para a construção de conclusões.

3.5.1 Rendimento da Produção

O rendimento do processo de produção das micropartículas é calculado por meio da porcentagem da relação entre a massa final obtida e a somatória das massas de matérias-primas utilizadas (MÜHLEN, SCHWARZ, MEHNERT, 1998).

3.5.2 Doseamento de Estigmasterol Contido nas Micropartículas

A concentração de estigmasterol contido nas micropartículas foi determinada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de absorção de radiação ultravioleta, no equipamento descrito anteriormente (3.2.4.1) e sob as mesmas condições.

Contudo, as micropartículas produzidas são inviabilizadas de serem injetadas no sistema cromatográfico, portanto o doseamento realizado é do filtrado resultante da produção das mesmas, determinando-se indiretamente a concentração de estigmasterol microencapsulado. No caso do doseamento envolvido nos estudos de absortividade e de estabilidade, a suspensão de micropartículas é amostrada e posteriormente submetida a filtração em funil sinterizado classificação G4 para a separação das micropartículas e captação do sobrenadante. Em seguida promove-se a secagem do solvente a 50°C e a solubilização do resíduo em metanol-acetonitrila (30 : 70) para o doseamento indireto por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tendo sido obtido o valor da concentração de estigmasterol microencapsulado, pode-se determinar a razão de eficácia de microencapsulamento (VANDERVOORT, LUDWIG, 2004), por meio da fórmula

$$\text{Eficácia (\%)} = \frac{\text{massa de fármaco nas micropartículas}}{\text{massa de fármaco usado na formulação}} \times 100$$

3.5.3 Tamanho e Morfologia das Micropartículas

A avaliação da morfologia e dimensões das micropartículas realizou-se por meio de visualização em microscópio eletrônico de varredura, de acordo com SOUZA (1998).

Para tanto, parte do resíduo da filtração final realizada durante a produção das micropartículas é submetida a liofilização após congelamento por duas horas de refrigeração a -2°C , em equipamento liofilizador Modulyo Edwards® sob as condições de temperatura -50°C e pressão de 6 atm. A metalização com ouro das amostras é procedida em equipamento metalizador Balzers Sputtering SCD-030, por dois minutos sob as condições de pressão menores que 0,1 mbar e intensidade de corrente elétrica de 30 mA; após fixação das mesmas em suportes de 1cm de diâmetro para microscópio eletrônico de varredura Edax CDU Leap (20 kV), e em suportes de 0,5cm de diâmetro para microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV (15 kV), com o auxílio de fita elétrica Ruban Isolant 3M®.

O registro das imagens visualizadas (micrografias) por análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) é realizado por meio da utilização do software específico acoplado ao equipamento, fornecido pelo seu fabricante.

3.5.4 Avaliação de Absortividade e Permeação em Tecido Cutâneo

O estudo de absortividade inicia-se determinando o coeficiente de partição óleo-água do fármaco, e assim a sua classificação biofarmacêutica; para então verificar a perfil de liberação do mesmo pelas micropartículas por meio do teste de dissolução, determinando a disponibilidade do fármaco para a absorção intestinal.

A absortividade por via percutânea, por sua vez, é determinada após o coeficiente de partição óleo-água, por meio do teste de permeação em *stratum corneum* epidérmico.

3.5.4.1 Coeficiente de partição óleo-água

O coeficiente de partição é definido como o grau de equilíbrio das concentrações de uma substância dissolvida em um sistema bifásico consistente em dois solventes altamente imiscíveis. Segundo RIEGO-SINTES (1992), é determinado pelo método de *shake flask*, envolvendo água e n-octanol como solventes imiscíveis, medidos acuradamente em igual volume e postos em contato com a amostra a ser testada, sob condições de temperatura estável ($\pm 1^\circ\text{C}$) entre 20°C e 25°C . Procedese então agitação mecânica por cinco minutos, e após a separação das fases, promove-se doseamento da substância em ambas as fases, segundo metodologia já descrita (3.5.2), comparando-se com a quantidade de substância originalmente introduzida no sistema.

O coeficiente de partição é o resultado da razão entre as duas concentrações e geralmente é dado na forma de seu logaritmo na base 10 ($\log P$):

$$P_{o/a} = \frac{C_{n\text{-octanol}}}{C_{\text{água}}}$$

Sendo: $P_{o/a}$ = coeficiente de partição óleo-água, $C_{n\text{-octanol}}$ = concentração do fármaco em n-octanol, $C_{\text{água}}$ = concentração do fármaco em água.

O valor do coeficiente de partição óleo-água tem como importância a determinação de especificações de dissolução in vitro, a previsão do sucesso da correlação in vitro-in vivo, ou seja, se os valores obtidos nos testes in vitro para a determinação da absorvidade correspondem ao comportamento da amostra in vivo; por meio da determinação da classificação biofarmacêutica do fármaco, recomendado por autoridades farmacêuticas internacionais (GASPAROTTO, 2005).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) é verificado com base na solubilidade e permeabilidade dos fármacos, sendo que os fármacos que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade enquadram-se na classificação (I); os com baixa solubilidade em água e alta permeabilidade, na classificação (II); alta solubilidade e baixa permeabilidade, classificação (III); enquanto fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade pertencem à classe (IV) (FDA, 1997; ANVISA, 2001).

A solubilidade do fármaco é determinada pela dissolução da dosagem terapêutica mais alta do mesmo em 250mL de uma solução de pH entre 1,0 e 8,0. Um fármaco é considerado altamente solúvel quando o resultado, em volume, da

relação dose/solubilidade é menor ou igual a 250mL (razão (D : S) < 250 mL) (LINDENBERG, KOPP, DRESSMAN, 2004; GASPAROTTO, 2005).

Para a determinação da permeabilidade, o órgão americano de controle de fármacos, *Food and Drug Administration* (FDA), recomenda dados farmacocinéticos em humanos, dados de ensaios de perfusão em humanos, dados de modelos animais *in vivo* ou *in situ*, ou resultados em cultura celular monoestratificada previamente validada (LINDENBERG, KOPP, DRESSMAN, 2004). Podem também ser utilizados dados físico-químicos como peso molecular e coeficiente de partição óleo-água para estabelecer o coeficiente de permeabilidade (MOSS *et al.*, 2002). Quando o valor de logP encontra-se entre 0,0 e 5,0; prevê-se que a sua permeabilidade em membranas celulares é ampla.

A relação quantitativa estrutura química-permeabilidade pode prever o coeficiente de permeabilidade (Kp) principalmente para permeação cutânea, por um modelo completamente teórico que estima Kp assumindo a espessura de difusão do fármaco através do *stratum corneum* como L=15µm (espessura média do *stratum corneum* em pele de mamíferos), com base em um algoritmo de solubilidade-difusão usando o coeficiente de partição óleo-água (logP) e o peso molecular (PM) do composto. Para substâncias esteroidais, o modelo mais significativo é (CHIEN, 1991; PIROT *et al.*, 1997; MOSS, CRONIN, 2002):

$$\log Kp = 0,74.\log P - 0,0091.PM - 2,39$$

Os valores de coeficiente de permeabilidade aumentam com o coeficiente de partição óleo-água até determinado limite e então diminuem em valores maiores, em uma função matemática parabólica. Um equilíbrio hidrófilo-lipófilo ótimo é portanto essencial para a penetração cutânea de fármacos (SINGH, ROBERTS, 1994)

3.5.4.2 Perfil de dissolução

Entre o momento da administração do fármaco e a obtenção do efeito desejado, diferentes fases são ultrapassadas, denominadas biofarmacêutica, farmacocinética (estudo dos processos de absorção, distribuição e eliminação) e farmacodinâmica (estudo da relação entre a concentração do fármaco no sítio de ação e a resposta farmacológica observada). A etapa biofarmacêutica se caracteriza pela disponibilização do fármaco ao organismo. No primeiro momento, corresponde

à liberação do fármaco da forma farmacêutica para em seguida ocorrer a sua dissolução (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003).

O teste de dissolução é preconizado oficialmente pela FARMACOPÉIA (1988) e pela USP23 (1995). A sua importância está na determinação da velocidade de liberação de fármacos no trato gastrointestinal, verificando assim o grau de disponibilização dos mesmos para a absorção por via oral (AULTON, 2005).

Os livros oficiais preconizam diversos aparatos para a realização do ensaio de dissolução, cada qual apropriado para formas farmacêuticas específicas. O método de béquer citado por AULTON (2005) é adaptado da metodologia de Levy e Hayes, ou método do frasco com agitação, de acordo com a possibilidade de disposição de instrumentos para a realização do ensaio. O aparato utilizado consiste em sistema de agitação magnética Dist® acoplado a alimentação com água aquecida a 37°C, formando um banho-maria a temperatura controlada no qual são imersos béqueres contendo meio de dissolução e amostra a ser analisada, passíveis de serem submetidos à agitação do sistema.

O perfil de dissolução é avaliado por meio da submissão da preparação (as micropartículas) a um meio de dissolução sob agitação. A mimetização das condições fisiológicas do trato gastrointestinal se dá pela utilização de um sistema mantido a agitação de velocidade próxima a 100rpm e temperatura de 37°C controladas e constantes, por todo o tempo dispendido para o ensaio. A amostra (10mL) é submetida ao meio de dissolução solução de ácido clorídrico 0,1N, a pH 1,2, por duas horas, simulando as condições estomacais após a ingestão; e posteriormente é adicionado tampão fosfato alcalino com excesso de NaOH, levando o pH do meio de dissolução a 7,4, para a continuidade do ensaio por mais quatro horas, simulando as condições da porção inicial do intestino delgado. As amostras são coletadas em volume de 5mL e em porções de tempo determinadas para proceder ao doseamento de fármaco por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando metodologia descrita previamente (3.5.2), tomando-se o cuidado da devolução do volume retirado na forma de meio de dissolução, evitando-se desvios de condições fisiológicas reais.

Uma vez obtido o perfil de liberação, deve-se definir o tipo de liberação assumido pela amostra. Para tanto, estudos de cinética de liberação devem ser realizados. Podem ser aplicados três modelos matemáticos que visam a

determinação da ordem do processo (COX et al., 1979; FERRAZ et al., 1998; COSTA, LOBO, 2001; ZARONI, 2006): (a) para cada amostra são plotados gráficos do tempo versus a subtração entre quantidade total (Q_a) e quantidade dissolvida do fármaco (Q), ($t \times Q_a - Q$), com a finalidade de verificar a cinética de ordem zero; (b) para cada amostra são plotados gráficos do tempo versus logaritmo da porcentagem não dissolvida do fármaco, ($t \times \log \%ND$), com a finalidade de verificar a cinética de primeira ordem; (c) para cada amostra são plotados gráficos da raiz quadrada do tempo versus a porcentagem dissolvida do fármaco, ($\sqrt{t} \times \%D$), com a finalidade de verificar a cinética de pseudo zero ordem ou Higuchi. Com base nos valores de coeficiente de correlação de Pearson (R^2) da equação da reta de regressão linear do intervalo em que ocorre a liberação do fármaco em cada um desses gráficos, seleciona-se o modelo mais adequado, ou seja, cujo R^2 seja mais próximo de zero. Uma vez selecionada a ordem da cinética da liberação, podem ser calculados o tempo em que 50% do fármaco é liberado ($t_{50\%}$) e a constante de velocidade de dissolução (K), valor esse relacionado com a inclinação da reta (FERRAZ et al., 1998; ZARONI, 2006).

A comparação dos perfis de liberação do fármaco pelas amostras analisadas pode ser realizada por meio da avaliação da curva como um todo, além de cada ponto de coleta, utilizando-se modelos matemáticos diferentes (GASPAROTTO, 2005).

Para avaliação da equivalência entre os perfis de liberação, um parâmetro de confiança é representado pelo cálculo da eficiência de dissolução (ED), qual permite avaliar não somente a quantidade de fármaco liberada ao fim de um determinado tempo, mas a cinética de liberação ao longo do período em questão; mantendo a vantagem de permitir relação teórica com os dados in vivo, uma vez que a extensão da absorção do fármaco nessa condição é proporcional à sua concentração dissolvida e ao tempo que permanece em contato com as regiões de absorção do trato gastrointestinal (MANADAS et al., 2002; ZARONI, 2006).

A ED é calculada a partir dos valores de área sob a curva e a área total do gráfico de perfil de dissolução (ZARONI, 2006). Os valores de ED são então comparados estatisticamente pelo teste t de *student* com um nível de significância de 0,05.

Para quantificar a comparação dos perfis de dissolução, existe um modelo independente que utiliza índices matemáticos para definir fator de diferença, f_1 , e fator de similaridade, f_2 . O fator f_1 calcula a porcentagem de diferença entre dois perfis avaliados a cada tempo de coleta, e corresponde a uma medida do erro relativo entre perfis. O fator f_2 , por sua vez, corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis (FDA, 1997; GASPAROTTO, 2005).

Com base nessa afirmativa, que está presente também na Normatização Brasileira (Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos (ANVISA, 2004)), podem ser calculados f_1 e f_2 entre os perfis de dissolução. O critério para que dois perfis sejam considerados semelhantes é f_1 com valor entre 0 e 15 e f_2 entre 50 e 100 (ANVISA, 2004; GASPAROTTO, 2005).

3.5.4.3 Ensaio de permeação cutânea

A verificação da absorvidade percutânea das amostras *in vitro* envolve a utilização da epiderme intacta, cuja camada superficial (córnea, ou *stratum corneum*) é tida como a grande barreira para a absorção de substâncias pela pele por ser composta por células mortas e inviabilizadas de absorver substâncias através da membrana (SCHAEFER, REDELMEIER, 1996).

Para a realização do ensaio de permeação cutânea *in vitro*, a técnica de “descamação por fita” (*tape stripping*) de acordo com KIELHORN, MELCHING-KOLLMUB, MANGELSDORF (2005), é pertinente para verificar o grau de penetração do fármaco nas camadas epidérmicas. Esta técnica baseia-se na correlação linear existente entre a quantidade de substância permeável no tecido cutâneo e a quantidade remanescente no estrato córneo em um tempo definido após a aplicação da amostra.

O tecido cutâneo proveniente de animais substituindo a pele humana tem sido aceito para estudos de penetração cutânea *in vitro*. Geralmente, as peles de porco e de rato têm-se demonstrado muito utilizadas, pois apresentam barreiras de difusão para a penetração similares às da pele humana para uma grande variedade de moléculas (MOSS *et al*, 2002). BARRY (1983) e CHIEN (1991) reportam a utilização de epiderme de barriga de rato em ensaios permeação cutânea. Portanto, o tecido cutâneo utilizado para os testes de permeação é proveniente de secção abdominal

de ratos Wistar machos de idade adulta e apresentando massas corpóreas entre 160g e 180g, após a retirada dos pêlos da região a ser incidida. A secção é realizada com o auxílio de bisturis e tomando o cuidado de retirar a camada hipodérmica das amostras cutâneas. O ensaio foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o número de registro 197.

O método utiliza cortes de epiderme de barriga de ratos Wistar de dimensões aproximadas de 4cm x 4cm, firmemente presos sobre um suporte. As amostras são então aplicadas sobre área de 4cm² previamente delimitada, e decorridos 30 minutos a temperatura de 25°C, as camadas epidérmicas serão retiradas com o auxílio de fita adesiva. Após o tratamento das fitas com metanol e doseamento do fármaco por metodologia já descrita (3.5.2), o grau de permeação nas camadas epidérmicas é determinado. O resultado do ensaio por *tape stripping* é expresso em quantidade do fármaco em teste por área de fita adesiva (mg/cm²).

3.5.5 Avaliação da Estabilidade do Estigmasterol Microencapsulado

A avaliação da estabilidade do estigmasterol inicia-se com a verificação do seu perfil de degradação térmica. Para tanto, realizou-se um estudo que consistiu na submissão da substância a aquecimento controlado em estufa Olidef Cz EE Stabyk a 150°C por quatro horas, retirando-se amostras de 1mg em períodos determinados. As amostras foram solubilizadas em metanol – acetonitrila 30:70 (v/v) e submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência no equipamento já descrito e sob as mesmas condições (3.2.4.1). Com isso, pode-se prever a detecção dos componentes de degradação do fármaco pela metodologia analítica utilizada.

As micropartículas produzidas foram avaliadas quanto à sua estabilidade por meio do teste de estabilidade acelerada legalmente oficializada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), qual descreve no Anexo I da Resolução RE número 1 de 29 de julho de 2005 o referido estudo, que tem como finalidade aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância ou alterar formas farmacêuticas utilizando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento.

Segundo ANVISA (2005), o estudo de estabilidade acelerada deve ser executado sob as condições de temperatura $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa (UR), pelo período de seis meses, com análises de doseamento em 0, 60 e 180 dias.

No estudo em questão, foi realizado o estudo de estabilidade acelerada por seis meses em ambas as amostras, em estufa incubadora AC 60/HR Ação Científica® a temperatura regulada a 40°C e umidade relativa de 75%, com amostragens mensais para análise de doseamento conforme já descrito (3.5.2), durante todo o referido período de tempo.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do teste t de *student* bimodal pareado assumindo nível de risco significativo 0,05.

3.5.6 Redação do Documento Científico

A redação do documento referente à apresentação do trabalho incluindo revisão bibliográfica, metodologias utilizadas, resultados experimentais, discussão explicativa dos resultados obtidos e conclusões, está de acordo com a série Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA

Os valores médios obtidos para a determinação de umidade e de cinzas no material vegetal adquirido (tabela 1) foram de 89,5% e 5,59%, respectivamente, demonstrando que o material obtido encontra-se dentro dos valores oficiais especificados para vegetais, ou quando não disponíveis, daqueles dispostos em literatura (valores de umidade 75% - 92% (FRANCO, 1982)) e também para espécies pertencentes à mesma ordem taxonômica de *Musa paradisiaca* (valor limite de cinzas de 6,0%). Estando de acordo com as especificações, pode-se concluir que as condições de qualidade da fonte do estigmasterol são satisfatórias.

TABELA 1 – DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS EM *Musa paradisiaca*

PARÂMETRO	VALOR OBTIDO	VALOR DE REFERÊNCIA (FARMACOPÉIA, 1988)
UMIDADE (%)	89,5 (\pm 12,47)	Valores para drogas frescas não disponíveis
CINZAS TOTAIS (%)	5,59 (\pm 1,3)	6,0 (valor limite)

Os resultados obtidos para a análise fitoquímica do material vegetal adquirido estão dispostos na tabela 2, demonstrando a presença de flavonóides, esteróides, taninos e aminogrupos. Estes dados são pertinentes em relação aos encontrados em literatura, incluindo a presença de taninos capazes de promover adstringência característica e utilizada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997); a detecção de aminogrupos deve-se à presença de proteínas como tiramina, serotonina, dopamina, reportadas em literatura (NGO, DVORKIN, WHELAN, 2006); e os compostos fenólicos reportados na espécie incluem, além dos taninos, os flavonóides, prováveis responsáveis por alguns efeitos farmacológicos apontados (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER, 1997). Outros componentes presentes são ácidos graxos, e o teor de cinzas inclui os sais minerais reportados como altamente presentes em *Musa paradisiaca*.

TABELA 2 – DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES EM *Musa paradisiaca*

GRUPOS QUÍMICOS	EXTRATOS				
	AQUOSO	HIDROETANÓLICO	HEXÂNICO	DICLOROMETANO	ACETATO DE ETILA
Alcalóides	X	-	-	-	-
Leucocianidinas	X	-	-	-	-
Flavonóides	X	-	-	-	-
- Taubock	X	++	-	-	-
Cumarinas	X	-	-	-	-
Antraquinonas	X	-	-	-	+ fraco
Esteróides/ Triterpenos	X	-	++++ (verde)	+++ (verde)	-
Antocianinas	-	X	X	X	X
Heterosídeos saponínicos	-	X	X	X	X
Heterosídeos cianogenéticos	-	X	X	X	X
Taninos	Cloreto férico	+	X	X	X
	Gelatina	-	X	X	X
	Emetina	+	X	X	X
	Formol clorídrico (taninos condensados)	+	X	X	X
Aminogrupos	+	X	X	X	X
Ácidos fixos	-	X	X	X	X
Ácidos voláteis	-	X	X	X	X

(+) reação positiva, (-) reação negativa, (x) não aplicável.

*(+++++) escrutínio representante da intensidade de positividade

4.2 EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL A PARTIR DA AMOSTRA VEGETAL OBTIDA

O processo de extração da substância desejada resultou em 89,5% de material seco em relação à massa de material úmido coletado, qual resultou em 29,77% de extrato seco. Este último foi submetido à extração por partição sólido-líquido em soxhlet modificado resultando em 0,09% de estigmasterol impuro em relação à massa de material vegetal seco, e após à purificação por dupla recristalização, foi obtido estigmasterol purificado na proporção de 0,05% em relação ao material seco. O controle por cromatografia em camada delgada demonstrou Rf's de 0,26 para estigmasterol impuro e de 0,28 para estigmasterol puro (tabela 3).

TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL

MASSA MATERIAL SECO EM RELAÇÃO AO ÚMIDO (%)	MASSA EXTRATO SECO EM RELAÇÃO AO MATERIAL SECO (%)	MASSA ESTIGMASTEROL IMPURO EM RELAÇÃO AO MATERIAL SECO (%)	RF CROMATOGRÁFICA EM CAMADA DELGADA	MASSA ESTIGMASTEROL PURO EM RELAÇÃO AO MATERIAL SECO (%)	RF CROMATOGRÁFICA EM CAMADA DELGADA
89,5	29,77	0,09	0,26	0,05	0,28

O resultado da relação entre as massas de material seco e úmido representa o teor de umidade da amostra, que conforme já descrito (4.1), encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela especificação para materiais vegetais frescos. O extrato seco é obtido após a evaporação do solvente da última extração (hexano), e consiste na fonte direta de estigmasterol a ser separado por métodos cromatográficos.

A partição sólido-líquido foi realizada pela utilização de sistemas de solventes com polaridades crescentes (hexano, diclorometano e clorofórmio), sendo que os eluatos com características diferentes foram coletados separadamente. Com isso, foram obtidas sete frações, que frente à cromatografia em camada delgada apresentaram os resultados demonstrados na tabela 4 e figura 8. Verifica-se que o

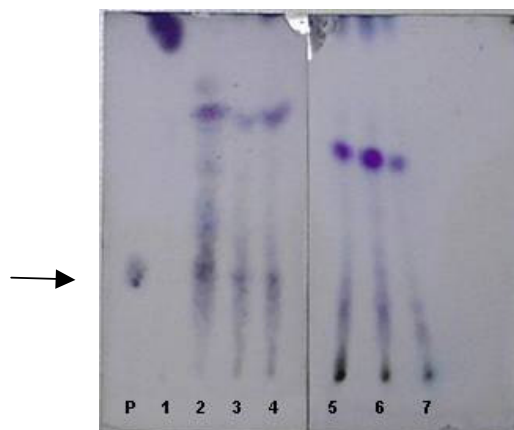
estigmasterol é presente nas frações 2 a 7, acompanhado de impurezas mais e menos polares.

Após a separação por partição sólido-líquido, as frações que contém estigmasterol são reunidas e submetidas à secagem de solvente e posteriormente à cristalização da substância utilizando éter de petróleo leve. Nesse contexto, obtém-se 0,097% de estigmasterol não puro em relação à massa seca, e a sua presença é confirmada junto a impurezas por meio de cromatografia em camada delgada conforme descrito anteriormente, detectando-o em Rf de 0,26 para as amostras aplicadas (figura 9). A purificação por dupla recristalização utilizando acetona e n-pentanol resultou em 0,05% de estigmasterol purificado em relação à massa seca, cuja confirmação por cromatografia em camada delgada acusou Rf de 0,28 para ambas as amostras e padrão de estigmasterol, além da ausência de outras substâncias passíveis de serem detectadas por meio da técnica utilizada. Os resultados obtidos nas etapas de purificação por meio de cromatografia em camada delgada estão representados na figura 9.

TABELA 4 – ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A EXTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL

FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA	SOLVENTE UTILIZADO NA CROMATOGRAFIA EM COLUNA	POLARIDADE	RF'S OBTIDOS EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA							
1	Hexano	0,0								0,95
2	Hexano	0,0	0,26	0,42		0,58	0,70	0,77	0,98	
3	Hexano	0,0	0,26	0,37		0,56	0,70		0,98	
4	Hexano	0,0	0,26	0,37		0,56	0,70		0,98	
5	Diclorometano	3,4	0,02	0,23	0,35			0,67	0,74	0,98
6	Diclorometano	3,4	0,02	0,23	0,32	0,38	0,49	0,67	0,74	0,98
7	Clorofórmio	4,4	0,02	0,23	0,32			0,67		0,98
Padrão			0,28							

FIGURA 8 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA NA EXTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL

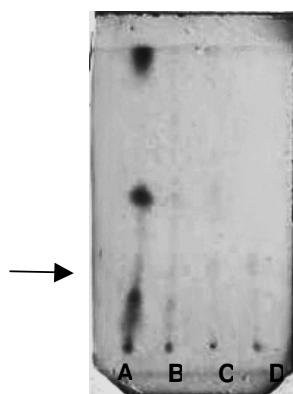


P: padrão

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: frações obtidas por eluição de solventes com gradual aumento de polaridade

Fase móvel da cromatografia em camada delgada : tolueno : acetato de etila (93 :7)

FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DA PLACA CROMATOGRÁFICA EM CAMADA DELGADA RESULTANTE DA ANÁLISE DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL



Fase móvel tolueno : acetato de etila (93 :7)

A) Etapa de separação por partição sólido-líquido

B) Etapa de purificação por cristalização com éter de petróleo

C) Etapa de purificação por recristalização com acetona

D) Etapa de purificação por segunda recristalização com n-pentanol

A confirmação de pureza realizada por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada após a validação da metodologia analítica.

4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A metodologia utilizada para doseamento foi escolhida com base não somente de dados bibliográficos encontrados (SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2004), mas também da realização de ensaio da separação cromatográfica líquida de alta eficiência eluindo solução padrão de estigmasterol com as mesmas condições de fase móvel e vazão, no sistema cromatográfico Shimatzu® modelo LC10AD com amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel DGU14A, forno de aquecimento de coluna CTO10A; provido de detector diodo de espectroscopia no UV modelo SPD-M10A.

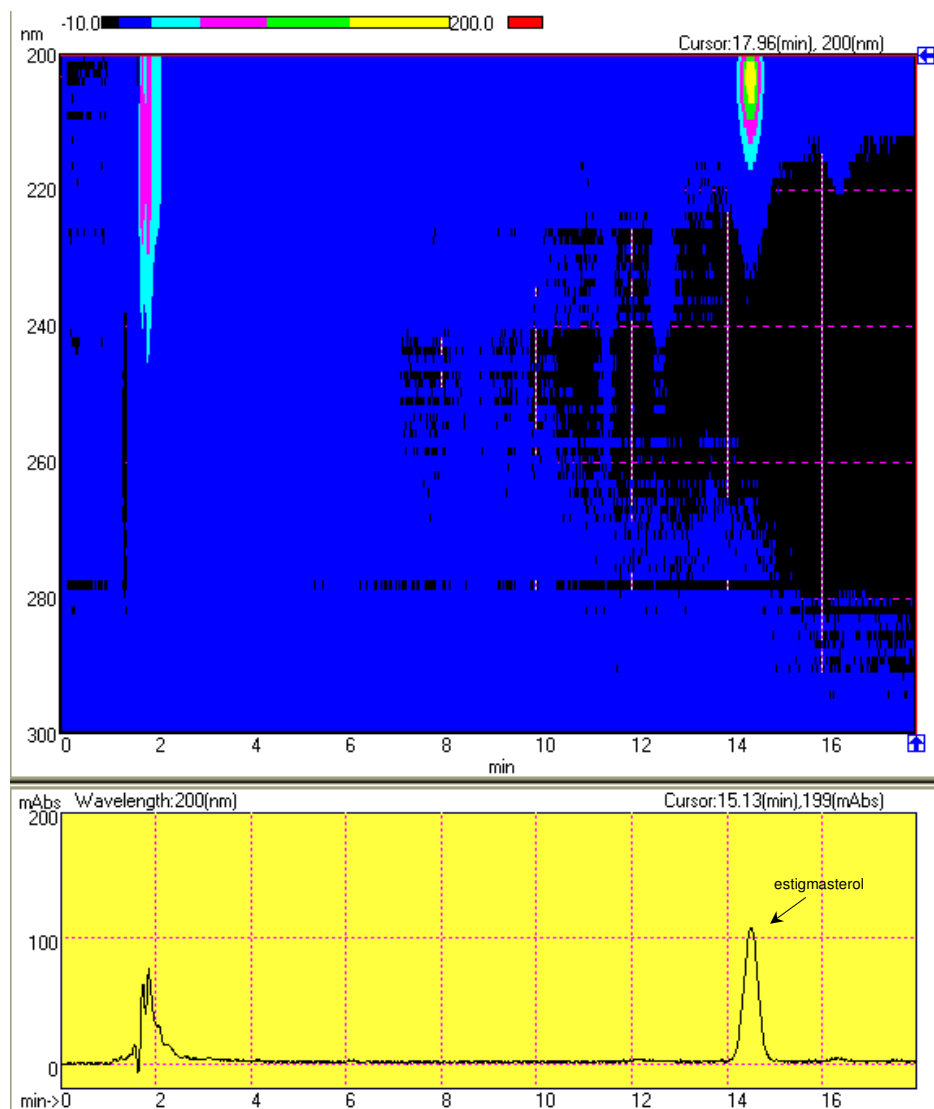
Tal detector permite a leitura paralela em vários comprimentos de onda do espectro ultravioleta-visível, realizando-se assim a varredura de comprimentos de onda absorvidos pela substância, a fim de determinar em qual comprimento de onda ocorre a absorção máxima de radiação emitida.

A eluição de solução padrão de estigmasterol resultou na obtenção de 13 sinais de absorção da radiação emitida, sendo que aquele detectado a cerca de 16 minutos de corrida cromatográfica não corresponde aos sinais obtidos pela eluição apenas do solvente da amostra, demonstrando então que este é capaz de absorver a radiação ultravioleta-visível, porém sem interferir a absortividade do estigmasterol, pela diferença dos tempos de retenção na eluição.

A figura 10 representa graficamente a intensidade de absortividade de radiação ultravioleta-visível relacionada ao comprimento de onda, demonstrando intensidade maior para os sinais obtidos pelo estigmasterol no comprimento de onda utilizado nos procedimentos de doseamento.

Observa-se que a maior intensidade de absorção pelo estigmasterol ocorre em comprimento de onda próximo a 200nm, e que os picos eluídos até dois minutos apresentam absortividade máxima em cerca de 210nm, e que a mesma não é tão intensa que o esteróide.

FIGURA 10 – INTENSIDADE DE ABSORTIVIDADE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL PELOS SINAIS PROVENIENTES DO SOLVENTE E DO ESTIGMASTEROL



A absorvidade máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) observada para o estigmasterol foi ao comprimento de onda de 204nm (gráfico 1), enquanto a dos sinais de absorção provenientes do solvente, denominados picos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L estão representadas na tabela 5. Contudo, o comprimento de onda no qual se obtiveram melhores resultados práticos para o processo de doseamento de estigmasterol, permitindo um equilíbrio entre ruído mínimo, mínima interferência quanto a absorvidade do solvente e proximidade do $\lambda_{\text{máx}}$ do estigmasterol, foi o de 205 nm.

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO DA VARREDURA DE COMPRIMENTOS DE ONDA DO ESPECTRO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL ABSORVIDOS POR ESTIGMASTEROL

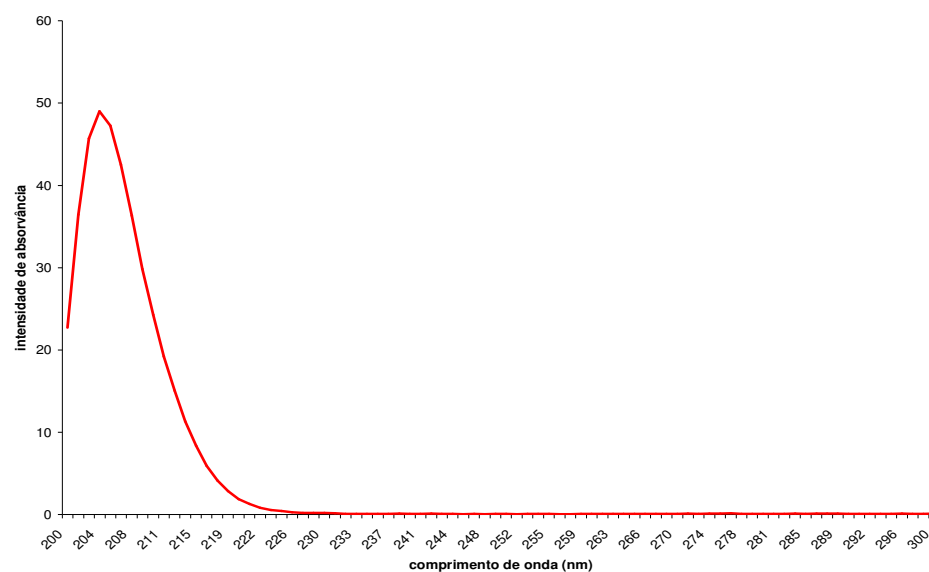


TABELA 5 – VALORES DE $\lambda_{MÁX}$ OBSERVADAS PARA OS SINAIS OBTIDOS NA ELUIÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE ESTIGMASTEROL

SINAIS PROVENIENTES DO SOLVENTE	$\lambda_{MÁX}$ (nm)
A	205
B	215
C	214
D	202
E	204
F	203
G	202
H	200
I	202
J	202
K	202
Estigmasterol	203
L	202

A validação da metodologia cromatográfica consistiu em determinar os limites de detecção (L_D) e de quantificação (L_Q), linearidade e precisão, segundo descrito por CARERI, ELVIRI, MANGIA (2001) e SHABIR (2004). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6, foi verificado LD de 0,0014mg/mL e LQ de 0,0042mg/mL. A linearidade foi observada no intervalo de 0,02 a 0,35 mg/mL com desvio padrão relativo de 3,16%, verificando-se uma precisão satisfatória do método.

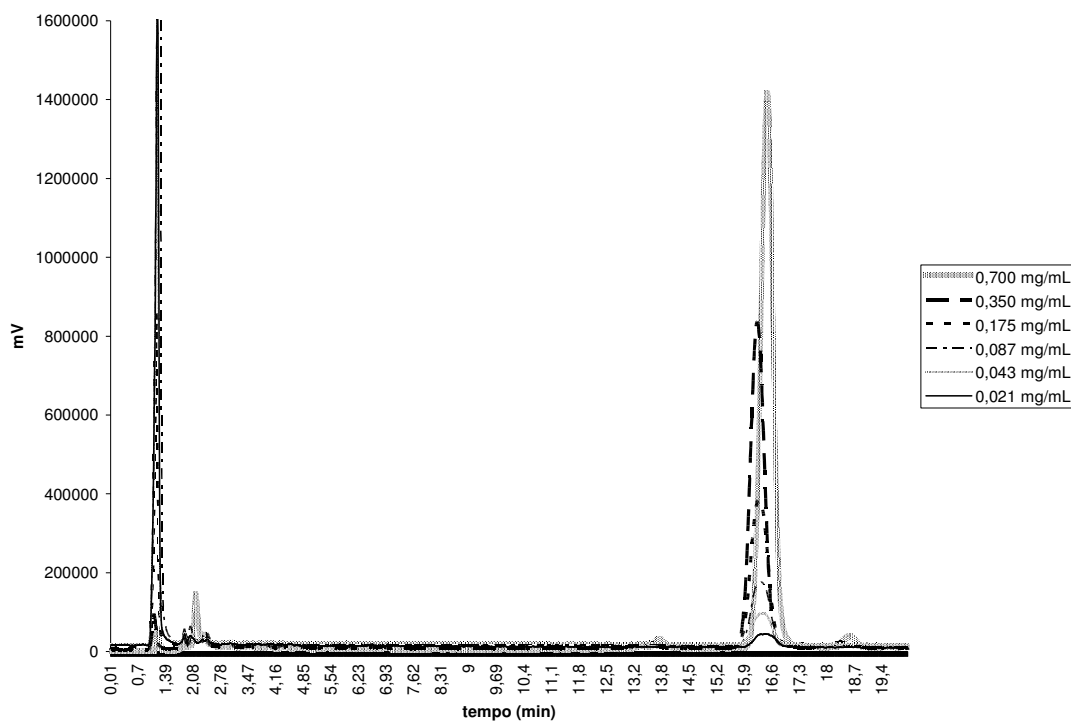
TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS PARA A VALIDAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

LIMITE DE DETECÇÃO	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	LINEARIDADE		PRECISÃO	
		Intervalo de concentração	0,35 – 0,02 mg/mL	Intervalo de concentração	0,35 – 0,02 mg/mL
0,0014 mg/mL	0,0042 mg/mL	Coeficiente de regressão (R^2)	0,998	Desvio padrão relativo (DPR)	3,16%*

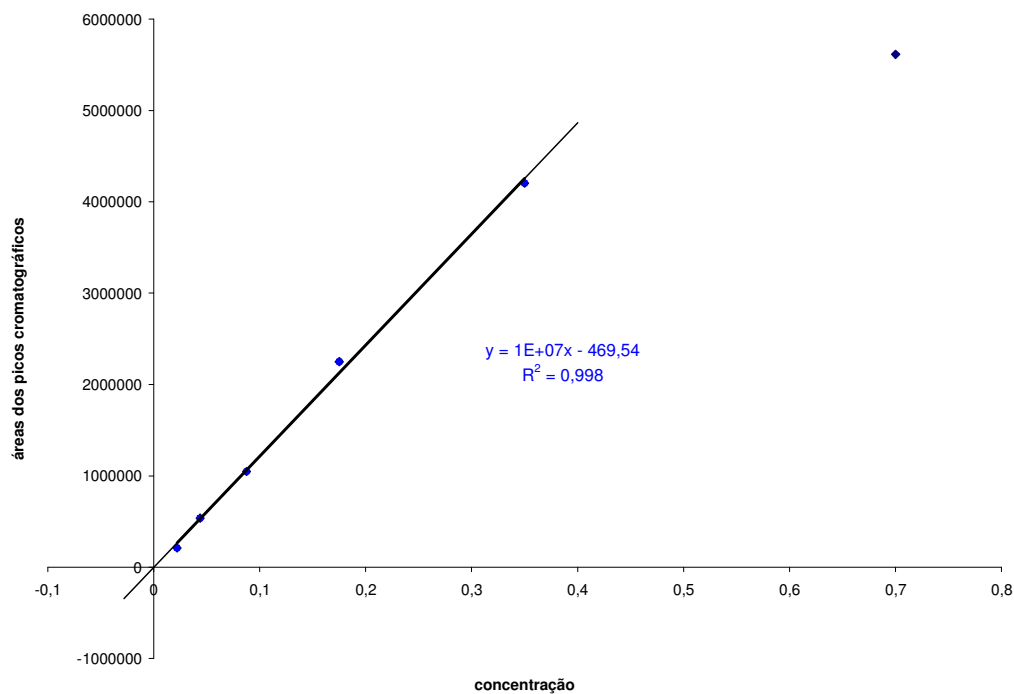
* Desejável = valores inferiores a 15%

A eluição do padrão em diversas concentrações, assim como curva de calibração construída a partir destes cromatogramas para avaliar a linearidade e para calcular as concentrações de estigmasterol nas amostras a partir da equação da reta pode ser observada no gráfico 2. Tais resultados demonstram que o intervalo de concentração no qual é possível dosear o estigmasterol por esta metodologia em modo fidedigno é compreendido entre 0,002 e 0,35 mg/mL, com coeficiente de regressão de Pearson de 0,998.

GRÁFICO 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O DOSEAMENTO DE ESTIGMASTEROL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA



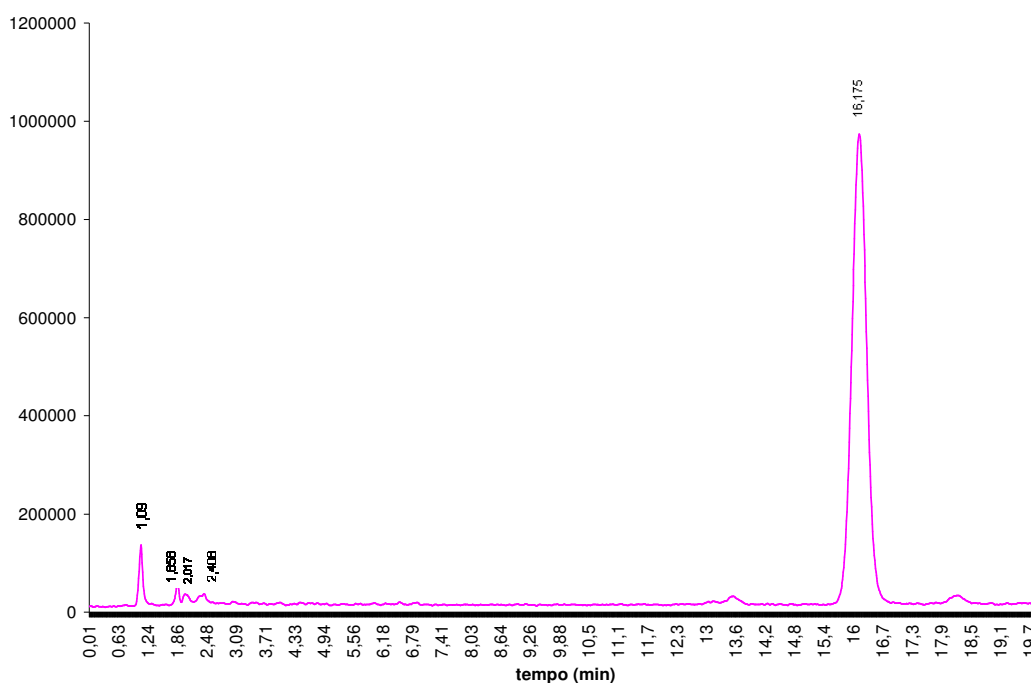
a) cromatogramas obtidos pela eluição dos padrões de estigmasterol a diferentes concentrações



b) curva de calibração obtida pelo doseamento de estigmasterol por meio dos cromatogramas obtidos

A eluição do padrão de estigmasterol (95%, Sigma-Aldrich®) sob as condições descritas (3.2.4.1) apresentou como tempo de retenção da substância 15,8 minutos, sendo que a sua eluição ocorreu até 16,8 minutos. O gráfico 3 exemplifica o cromatograma obtido por estigmasterol à concentração 0,35mg/mL.

GRÁFICO 3 – CROMATOGRAMA DE ESTIGMASTEROL A 0,35mg/mL EM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA



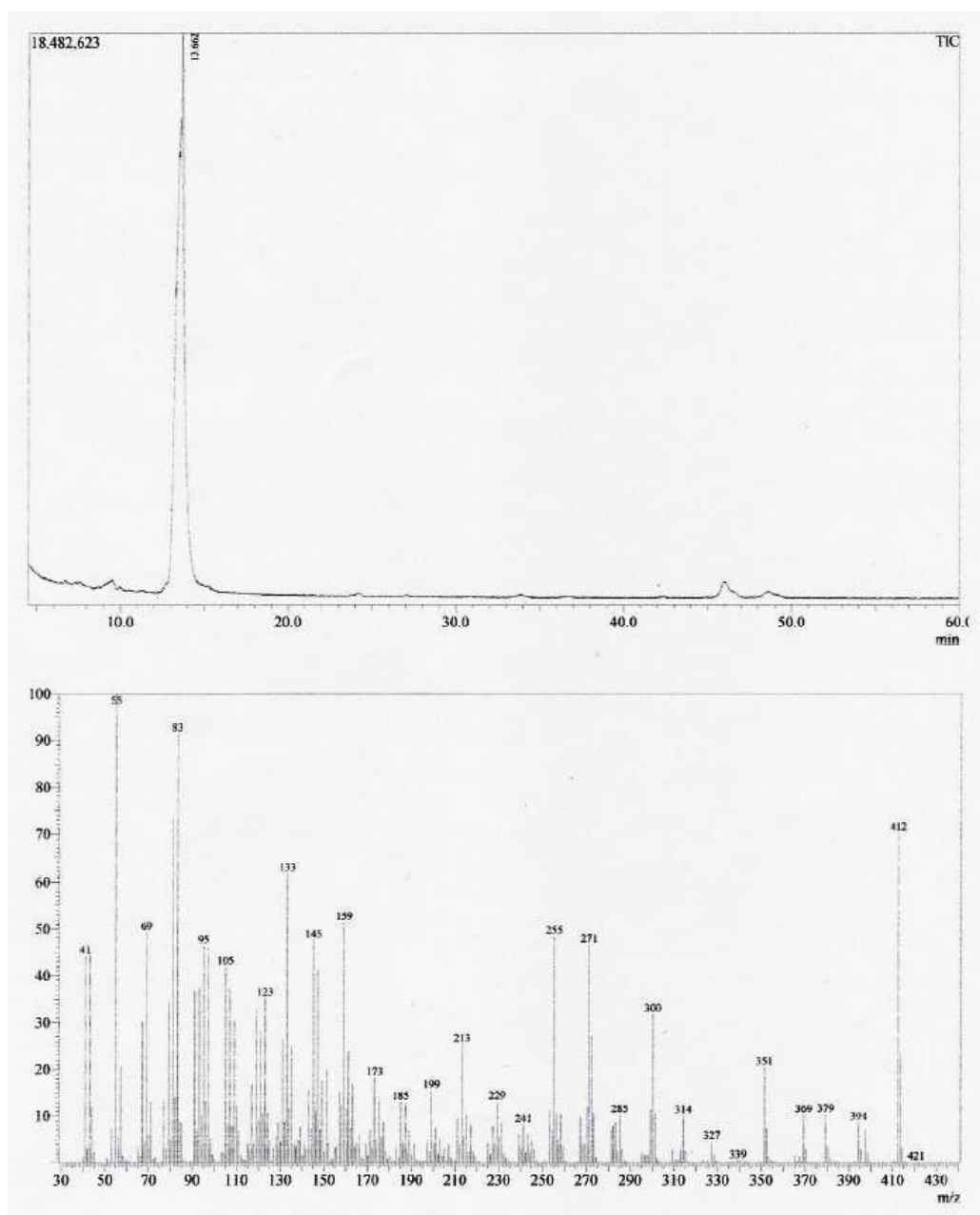
Os picos observados entre 1,09 e 2,41 minutos são provenientes do solvente utilizado (metanol-acetonitrila 30:70 v/v) conforme verificado pela eluição apenas do mesmo.

A eluição do estigmasterol obtido por extração de *Musa paradisiaca* demonstrou bons resultados devido à verificação de apenas um pico cromatográfico, indicando a pureza do material.

4.2.2 Cromatografia Gasosa

Para a confirmação da pureza do composto extraído, promoveu-se a eluição do mesmo em cromatografia gasosa conforme técnica já descrita (3.3.4.1). O cromatograma obtido e também o seu espectro de massa estão apresentados na figura 11.

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DO CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSA OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA



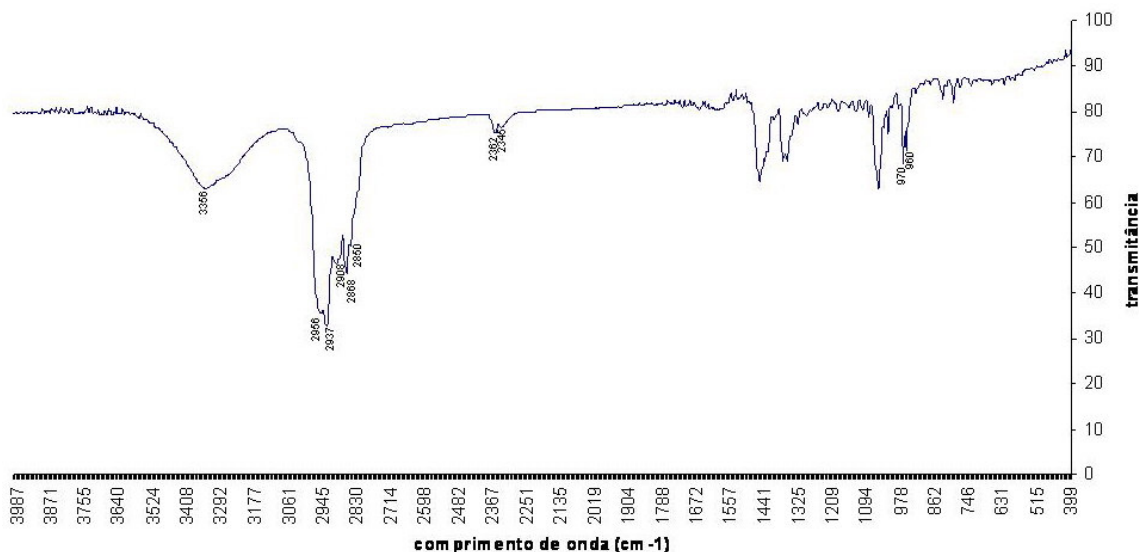
Verifica-se a presença de um pico majoritário eluído em 13,6 minutos cuja área representa 90,1% da somatória total das áreas dos picos obtidos no cromatograma, indicando o grau de pureza do composto isolado, tendo em vista que neste tipo de cromatografia ocorre a detecção de todos os compostos volatilizados. Tal dado é condizente com os obtidos por XU e colaboradores (2005), que obtiveram estigmasterol em grau de pureza de 95,3% a partir de uma mistura de fitoesteróides.

O espectro de massa obtido não apresenta interferências provenientes da presença de impurezas, confirmando o alto grau de pureza do composto extraído. Além de encontrar-se condizente com os dados de literatura, visto que HUNG e YEN (2001) obtiveram como espectro de massa do estigmasterol os resultados: m/z 412 (M^+ , 100), 369 (10), 351 (12), 300 (18), 255 (23), 213 (13), 105 (38); condizentes com os dados observados.

4.2.3 Espectrometria Sob Radiação Infravermelha

A identidade química do composto extraído pôde ser confirmada por meio da espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), de acordo com a técnica já descrita (3.3.4.2), e obtendo-se o espectro representado na figura 12.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DO ESPECTRO FT-IR DO ESTIGMASTEROL



Segundo XU e colaboradores (2005), o estigmasterol apresenta dois picos de absorção em 960 e 970 cm^{-1} (devido à dupla ligação *trans* em C-22) na região de “impressão digital” (*fingerprint*), observado no espectro obtido, além da semelhança com os espectros visualizados para o estigmasterol. Portanto confirma-se a identidade do composto isolado com base na observação dos espectros de massa e absorção no infravermelho obtidos.

As bandas obtidas no espectro são condizentes com a estrutura do estigmasterol. O quadro 6 apresenta as frequências de absorção dos grupamentos químicos de interesse para a estrutura em questão.

QUADRO 6 – FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO DE GRUPAMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NA ESTRUTURA DO ESTIGMASTEROL

GRUPAMENTO QUÍMICO	FREQUÊNCIA DAS BANDAS (cm^{-1})	OBSERVAÇÕES
- CH_2 - - CH_3	2960-2850 (s)	Geralmente duas ou três bandas
$\begin{array}{c} \quad \\ - \text{C} = \text{C} - \text{H} \end{array}$	3040-3010 (m)	Vibração da ligação C-H, eventualmente obscurecida pelas bandas de grupamentos C-H saturadas, que ocorrem em frequências abaixo de 3000 cm^{-1}
$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H} - \text{C} = \text{C} - \text{R} \end{array}$	970-960 (s)	Deformação C-H fora de plano. Quando a dupla ligação é conjugada, a banda sofre deslocamento.
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}_2 \text{C} = \text{C} - \text{R} \end{array}$	840-790 (m)	
-OH ligado	3200-2500 (v)	Largo; quanto menor a frequência, mais forte a ligação H-; eventualmente largo o suficiente para ser supervalorizado.
-O-H	1410-1260 (s)	Ligação O-H

FONTE: WILLIAMS, FLEMING, 1995

Portanto, a banda larga observada na frequência 3356 cm^{-1} , assim como a banda curta em 1382 cm^{-1} , correspondem ao grupamento hidroxila ligado em C-3; as bandas curtas em 2908 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} correspondem aos carbonos CH_2 e CH_3 saturados presentes em toda a estrutura química; o ombro observado em 3034 cm^{-1} corresponde à dupla ligação entre C-5 e C-6, cuja banda foi obscurecida pelas bandas intensas de C-H saturadas; a mesma dupla ligação fornece também a banda curta em 800 cm^{-1} . A dupla ligação entre C-22 e C-23 forneceu os picos em 970 cm^{-1} e 960 cm^{-1} , por ser em conformação *trans* e promover deformação da ligação C-H fora de plano quando submetida à energia da radiação infravermelha.

4.3 MICROENCAPSULAMENTO DO ESTIGMASTEROL

A produção de micropartículas foi realizada obtendo-se cerca de 90% de rendimento para as de revestimento protéico e 96% para as de revestimento lipídico, conforme demonstrado na tabela 7.

TABELA 7 – CÁLCULO DO RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

	MICROPARTÍCULAS DE GELATINA	MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO
MASSA DE MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA	106,5 g	101,55 g
MASSA DE MICROPARTÍCULAS OBTIDAS	96,05 g	98,07 g
RENDIMENTO (%)	90,19%	96,57%

O rendimento da produção reflete a porcentagem de micropartículas obtidas com respeito à quantidade total de material empregado. Trata-se, portanto, de um controle importante sob o ponto de vista econômico.

As micropartículas produzidas apresentam como características as descritas na tabela 8. Verifica-se que ambos os tipos de revestimento, protéico e lipídico, apresentaram formato esférico e dimensões variáveis, conforme observado por meio da observação por microscopia eletrônica (4.3.1). A concentração de estigmasterol verificada por cromatografia líquida de alta eficiência (4.3.2) determinou também a eficácia de encapsulamento a partir da sua relação com fármaco adicionado ao sistema durante a sua produção, sendo que para revestimento protéico a eficácia de encapsulamento foi de 97% enquanto o revestimento lipídico encapsulou o estigmasterol com eficácia de 94,4%. O conteúdo de fármaco foi determinado a partir da massa total das micropartículas e aquela de estigmasterol contida nas mesmas.

TABELA 8 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS PRODUZIDAS

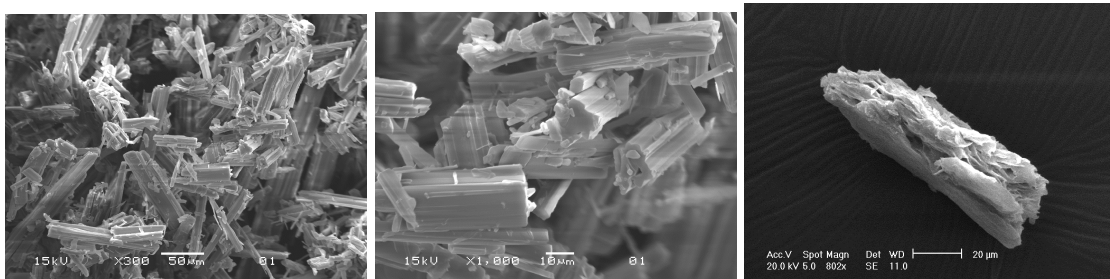
	MICROPARTÍCULAS REVESTIDAS COM GELATINA	MICROPARTÍCULAS REVESTIDAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO
TIPO DE REVESTIMENTO	Protéico	Lipídico
FORMATO	Esférico	Esférico
CLASSIFICAÇÃO	Microcápsulas	Microesferas
TAMANHO	8-15 μm	10-80 μm
CONCENTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL	0,485 mg/mL	0,472 mg/mL
EFICÁCIA DE MICROENCAPSULAMENTO	97%	94,4%
CONTEÚDO DE FÁRMACO	0,05%	0,05%

Observa-se que mesmo apresentando maior rendimento, as micropartículas de ácido esteárico não apresentam maior eficácia de microencapsulamento se comparadas com as micropartículas de gelatina. Isso demonstra a independência entre tais variáveis, e pode ser devida à característica que as microcápsulas lipídicas com revestimento composto de monoglicerídeos possuem de expelir o fármaco de acordo com a sua acomodação entre as cadeias hidrofóbicas do ácido graxo e de acordo com a sua cristalinidade (MÜLLER, MÄDER, GOHLA, 2000; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004); contudo vale lembrar que o aumento ponderado da quantidade de agentes tensoativos e aumento de tempo de agitação pode promover a melhoria dessas propriedades (MAGILL, 1991; MÜLLER, MÄDER, GOHLA, 2000).

4.3.1 Tamanho e Morfologia das Micropartículas

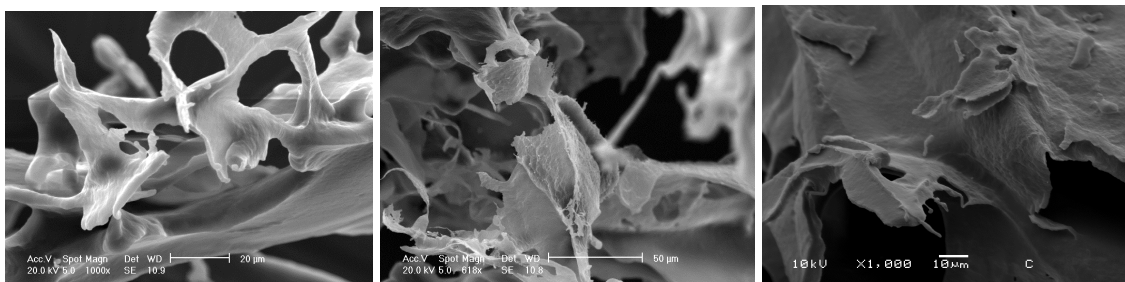
As características de tamanho e morfologia das micropartículas produzidas foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica. As figuras 13 a 17 apresentam as imagens obtidas na observação das micropartículas.

FIGURA 13 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE CRISTAIS DE ESTIGMASTEROL



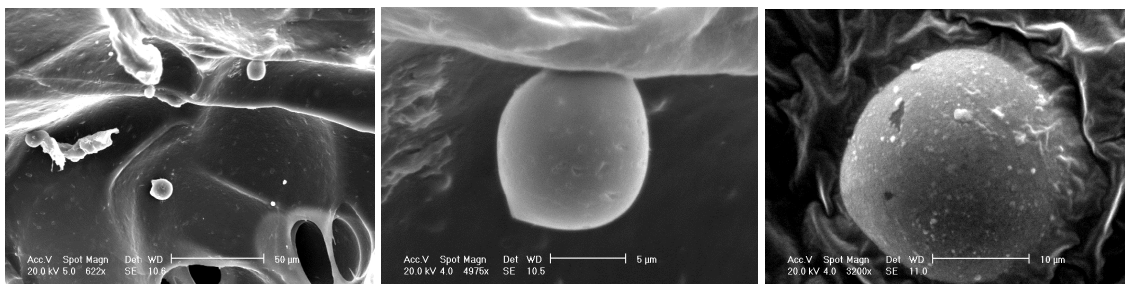
- (a) cristais de estigmasterol observados com aumento de 300x
- (b) cristais de estigmasterol observados com aumento de 1000x
- (c) cristal de estigmasterol isolado, aumento de 820x

FIGURA 14 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE GELATINA



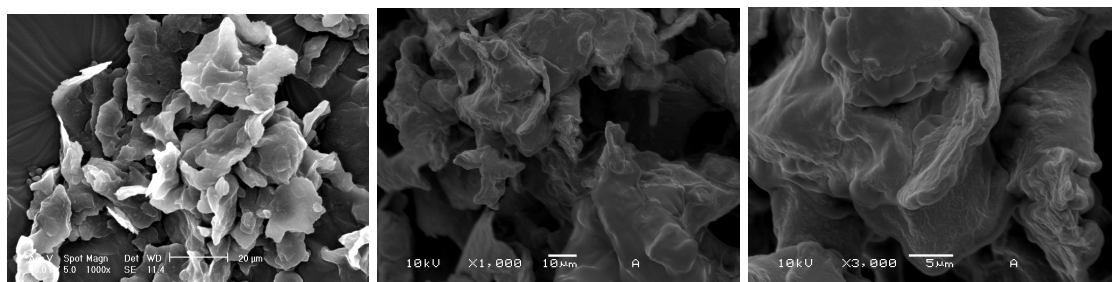
- (a) gelatina tratada da mesma forma que as micropartículas, observada com aumento de 1000x
- (b) controle negativo de micropartículas revestidas com gelatina, observado com aumento de 618x
- (c) controle negativo de micropartículas revestidas com gelatina, observado com aumento de 1000x

FIGURA 15 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM REVESTIMENTO DE GELATINA



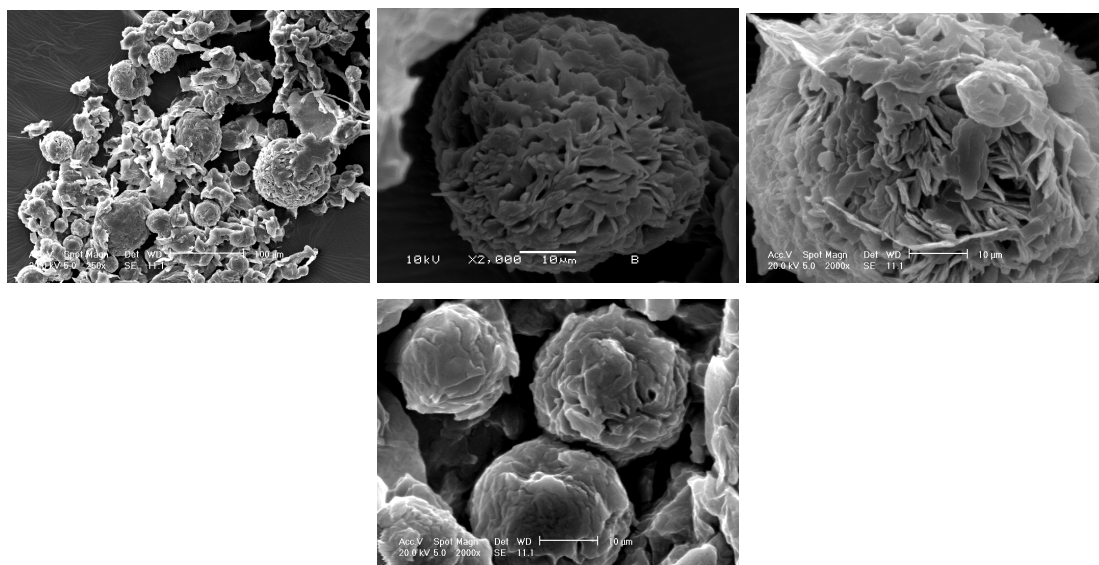
- (a) micropartículas com revestimento de gelatina depositadas sobre matriz de gelatina, observadas com aumento de 622x
- (b) micropartícula revestida com gelatina aderida sobre matriz de gelatina com superfície lisa, aumento de 4975x
- (c) micropartícula revestida com gelatina, com superfície sensível ao feixe de elétrons, observada com aumento de 3200x

FIGURA 16 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE ÁCIDO ESTEÁRICO



- (a) ácido esteárico tratado da mesma forma que as micropartículas, observado com aumento de 1000x
- (b) controle negativo de micropartículas revestidas com ácido esteárico, observado com aumento de 1000x
- (c) controle negativo de micropartículas revestidas com ácido esteárico, observado com aumento de 3000x

FIGURA 17 – MICROGRAFIAS OBTIDAS PELA OBSERVAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM REVESTIMENTO DE ÁCIDO ESTEÁRICO



- (a) micropartículas revestidas com ácido esteárico com diferentes dimensões. São também observadas escamas ceróticas de ácido esteárico. Observação com aumento de 250x
- (b) micropartícula revestida com ácido esteárico, de superfície irregular, observada com aumento de 2000x
- (c) micropartícula revestida com ácido esteárico, de superfície irregular com deposição de escamas ceróticas de ácido esteárico, observada com aumento de 2000x
- (d) micropartículas revestidas com ácido esteárico, de superfície menos irregular e dimensões menores, observadas com aumento de 2000x

As micrografias demonstram que as micropartículas de revestimento protéico (gelatina) apresentam-se de dimensões reduzidas e menos variáveis (8-15 μ m) em comparação às micropartículas de revestimento lipídico (10-80 μ m). Isto pode ser devido também à metodologia utilizada para a sua síntese, já que a agitação

ultrasônica permite a formação de partículas menores do que a simples agitação mecânica. De acordo com suas dimensões, as partículas obtidas são classificadas como micropartículas, visto que são maiores do que 1 μ m (dimensão máxima de nanopartículas).

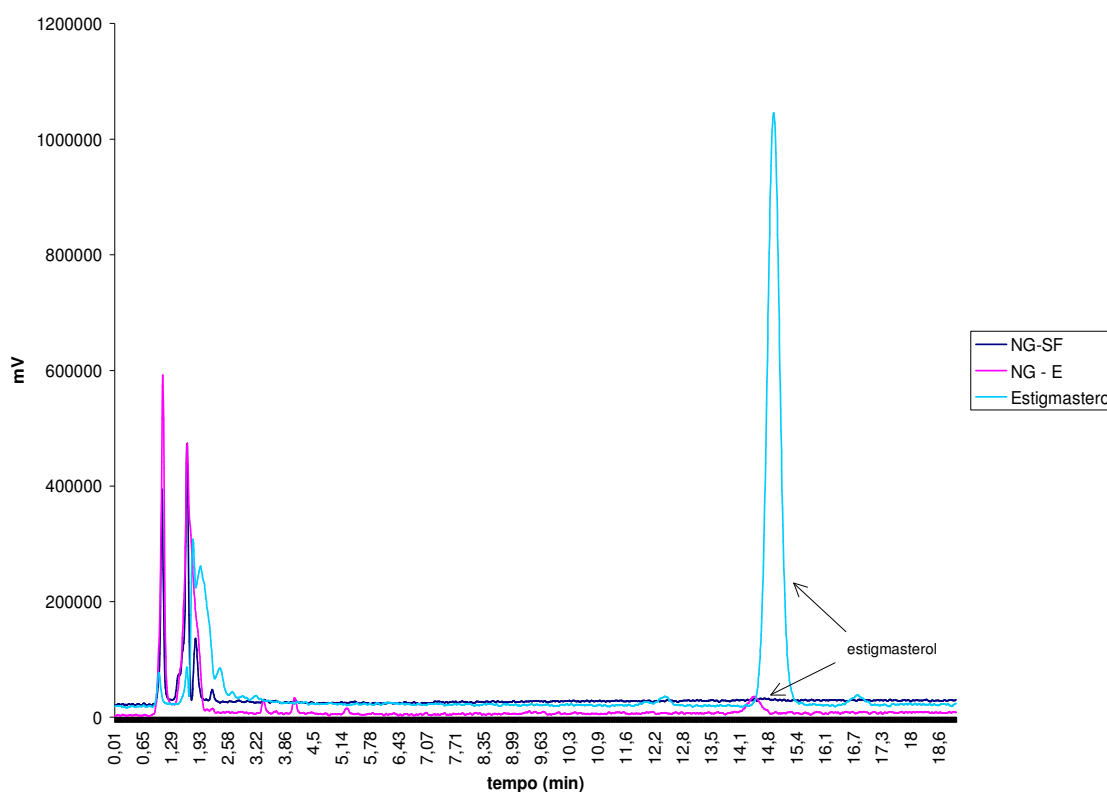
As micropartículas de ácido esteárico apresentam-se em formato esférico e superfície relativamente rugosa e irregular; a sugestão de aumentar a quantidade ou o número de agentes tensoativos durante a produção das micropartículas pode representar esforços para reduzir suas dimensões e promover a deposição regular das escamas ceróticas do ácido graxo sobre a superfície da partícula. As micropartículas de gelatina, por sua vez, apresentam superfície regular e formato esférico. Tendo em vista a propriedade lipossolúvel do estigmasterol, as micropartículas de gelatina enquadram-se na classificação de microcápsulas, nas quais o revestimento protéico envolve o núcleo lipofílico; enquanto o ácido esteárico, por dissolver o estigmasterol durante o processo de preparação das micropartículas, resulta em microesferas, nas quais o fármaco e o componente de revestimento formam uma matriz única.

São observados também restos de componentes de revestimento em ambas as preparações, que poderiam ser aproveitados em um grau maior com a ampliação do tempo de agitação enquanto presentes em solução, durante o preparo das micropartículas. Não foram observados cristais de estigmasterol dentre as estruturas observadas em torno às micropartículas; identificadas por meio da comparação com as imagens obtidas pela observação dos componentes de revestimento sem a presença do fármaco, assim como do fármaco purificado.

4.3.2 Concentração de Estigmasterol Contido nas Micropartículas

Os cromatogramas obtidos para o doseamento de estigmasterol contido nas micropartículas estão representados nas figuras 18 e 19. Ambas demonstram que o pico do controle positivo (solução hidroetanólica de estigmasterol) teve tempo de retenção comparável aos picos de estigmasterol provenientes das eluições das amostras, os quais apresentam pequena área por serem representativos da concentração de estigmasterol não-encapsulado contido no sobrenadante das soluções de micropartículas obtidas.

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM CLAE PARA MICROPARTÍCULAS DE REVESTIMENTO PROTÉICO

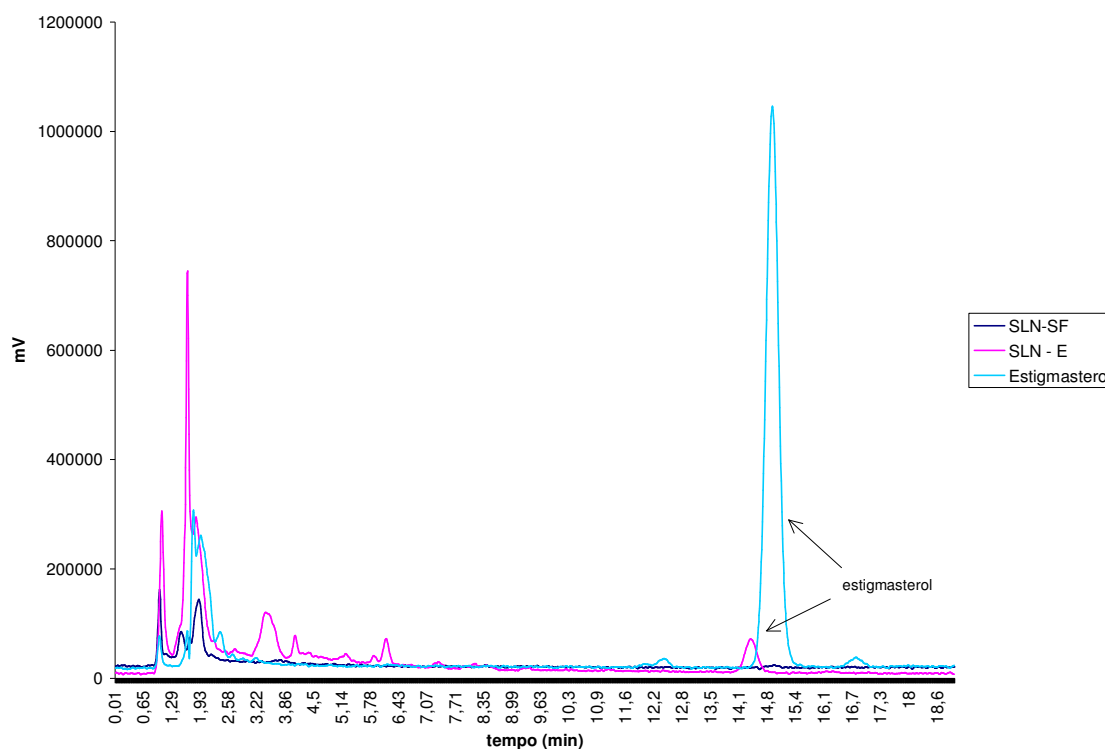


NG-SF: micropartículas com revestimento de gelatina sem fármaco

NG-E: micropartículas com revestimento de gelatina com estigmasterol

Estigmasterol solubilizado no mesmo veículo da suspensão de micropartículas (etanol a 50%)

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM CLAE PARA MICROPARTÍCULAS DE REVESTIMENTO LIPÍDICO



SLN-SF: micropartículas com revestimento de ácido esteárico sem fármaco

SLN-E: micropartículas com revestimento de ácido esteárico com estigmasterol

Estigmasterol solubilizado no mesmo veículo da suspensão de micropartículas (etanol a 50%)

A quantidade de estigmasterol não encapsulado contida no sobrenadante foi calculada por meio da equação da reta da curva de calibração (gráfico 2b) e os valores das áreas dos picos obtidos. Tais dados encontram-se descritos na tabela 9, verificando-se que a diferença entre a concentração de estigmasterol do sobrenadante e o estigmasterol adicionado durante a produção das micropartículas resulta na concentração encapsulada de estigmasterol. Portanto, para as micropartículas com revestimento de gelatina, observou-se concentração de estigmasterol não encapsulado de 0,015mg/mL e estigmasterol encapsulado na concentração de 0,485mg/mL, com eficácia de encapsulamento de 97%; enquanto que para micropartículas revestidas com ácido esteárico, as concentrações de estigmasterol não encapsulado e encapsulado são de 0,028 e 0,472 mg/mL, respectivamente, com eficácia de encapsulamento de 94,4%.

TABELA 9 – DOSEAMENTO DE ESTIGMASTEROL CONTIDO NAS MICROPARTÍCULAS

	MICROPARTÍCULAS DE GELATINA (NG - E)	MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO (SLN - E)
ÁREA DO PICO DE ESTIGMASTEROL NÃO ENCAPSULADO (mV)	154379	281248
CONCENTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL NÃO ENCAPSULADO	0,015 mg/mL	0,028 mg/mL
CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PARA 100% ENCAPSULAMENTO	0,5 mg/mL	0,5 mg/mL
CONCENTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL ENCAPSULADO	0,485 mg/mL	0,472 mg/mL
CONTEÚDO DE ESTIGMASTEROL	0,05%	0,05%
EFICÁCIA DE ENCAPSULAMENTO	97%	94,4%

O conteúdo de estigmasterol pode ser determinado por meio do cálculo da porcentagem da relação entre a quantidade de fármaco encapsulado e a massa final das micropartículas produzidas. A eficácia de encapsulamento, por sua vez, envolve a relação entre a quantidade de estigmasterol empregada na preparação e a efetivamente encapsulada.

Os dados observados em literatura apontam que, para fármacos de natureza lipofílica, a eficácia de microencapsulamento em revestimento de gelatina é de 60-90% (MAGILL, 1991), e em revestimento lipídico é bastante variável, podendo ser de 50-60% (CAVALLI *et al.*, 1999) ou mesmo de 85-99% (MÜHLEN, SCHWARZ, MEHNERT, 1998). Portanto, os resultados obtidos superam a expectativa quanto à eficácia de encapsulamento.

4.3.3 Avaliação de Absortividade e Permeação em Tecido Cutâneo

4.3.3.1 Coeficiente de partição óleo-água

Os resultados obtidos no ensaio de determinação do coeficiente de partição óleo-água estão expressos na tabela 10:

TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO-ÁGUA

AMOSTRA	QUANTIDADE DE FÁRMACO INSERIDA NO SISTEMA (mg)	VOLUME TOTAL (mL)	CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACO FINAL (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO NAS FASES (mg/mL)		P O/A	LOG P
				OCTANOL	ÁGUA		
Estigmasterol	0,41	5	0,082 ($\pm 0,005$)	0,1447 ($\pm 0,009$)	1×10^{-7} ($\pm 0,00$)	1446943	6,16
Micropartículas gelatina	0,485	5	0,097 ($\pm 0,014$)	0,0789 ($\pm 0,005$)	1×10^{-7} ($\pm 0,00$)	789062	5,90
Micropartículas ácido esteárico	0,472	5	0,0944 ($\pm 0,007$)	0,1081 ($\pm 0,008$)	0,0075 ($\pm 0,016$)	14,3934	1,16
Controle Negativo gelatina	0,00	5	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00	-
Controle Negativo ácido esteárico	0,00	5	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00	-

Os baixos valores de logP observados demonstram o grau de hidrofobicidade entre as preparações, sendo que o estigmasterol sem microencapsulamento representa maior hidrofília (logP = 1,16), seguido do estigmasterol microencapsulado com revestimento de gelatina (logP = 5,90) e então de ácido esteárico (logP = 1,16). O revestimento lipofílico provavelmente atuou como tensoativo, aumentando a dispersão do estigmasterol em solução aquosa, e foi o único cujo valor de coeficiente de partição óleo-água encontra-se como favorável à permeação cutânea. Baseando-se somente no logP, pode-se afirmar que o estigmasterol não apresenta boa permeação em membranas celulares, confirmando-se por dados em literatura, visto que sabe-se que apresenta baixa absorção pelo organismo através de enterócitos (MATVIENKO *et al.*, 2002). O revestimento protéico (gelatina) promove alguma melhora na permeabilidade, contudo o revestimento lipídico (ácido esteárico) aumenta notavelmente esta propriedade.

No entanto, para a predição da sua absorvidade por via oral ou percutânea, deve ser verificada a classificação do fármaco de acordo com o SCB (tabela 11). Para tanto, são calculados também o seu coeficiente de permeabilidade e a sua solubilidade com base na dose terapêutica, que para o efeito hipocolesterolêmico, segundo VAN DOKKUM (2006), é de 1 a 3g diários.

TABELA 11– DADOS NECESSÁRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO ESTIGMASTEROL DENTRO DO SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

SOLUBILIDADE				PERMEABILIDADE		
DOSE (mg)	SOLUBILIDADE (mg/mL)	D:S (mL)	PARÂMETRO	PESO MOLECULAR (g/mol)	COEFICIENTE PARTIÇÃO O-A (LOG P)	COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE (LOG KP)
3000	0,0000001	3000	250 mL	412,67	6,16	-1,58

Tendo em vista que o valor de 3000mL verificado para a relação entre a dose máxima e a solubilidade do estigmasterol em solução aquosa com pH entre 1,0 e 8,0 (1×10^{-7} mg/mL) é maior do que 250mL, o estigmasterol é considerado insolúvel. O coeficiente de permeabilidade determinado como valor próximo a zero demonstra que o estigmasterol, **em teoria**, apresenta alta permeabilidade, o que nos faz concluir que enquadra-se na classe biofarmacêutica II, com baixa solubilidade em água e alta permeabilidade.

4.3.3.2 Perfil de dissolução

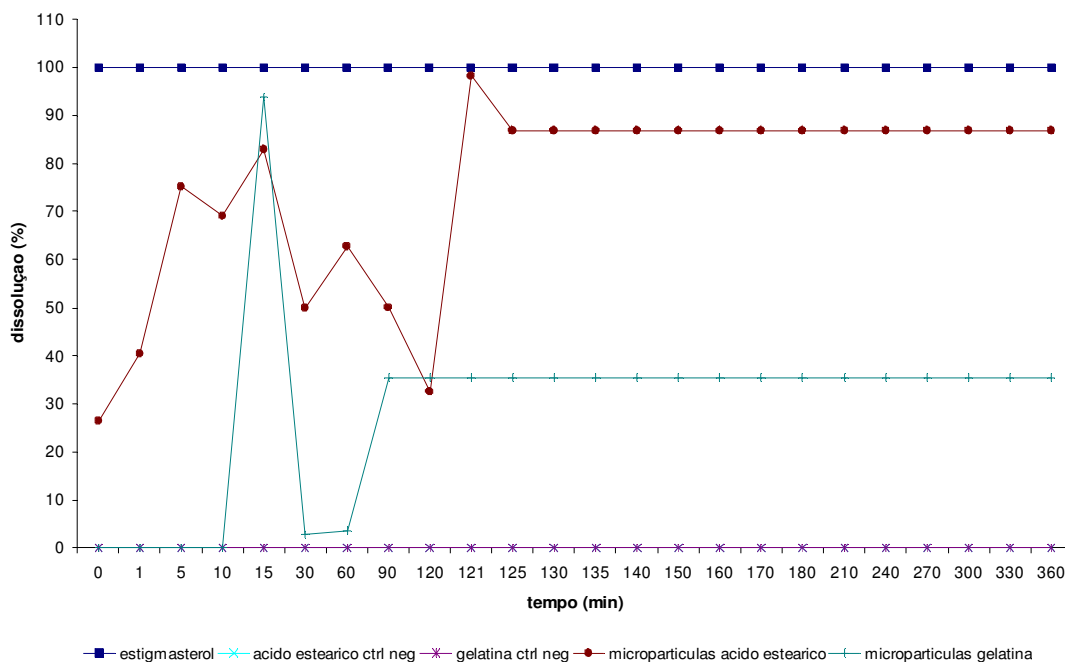
Os resultados obtidos durante o teste de dissolução estão representados na tabela 12 e gráfico 4. A necessidade de manter o fármaco sob condições *sink* (ou seja, diluído em quantidade de solvente dez vezes maior do que a sua solubilidade) trouxe dificuldades para o seu doseamento, devido à diminuição da sensibilidade de detecção do cromatógrafo, embora ainda dentro do limite calculado durante a validação do método de doseamento (4.2.1). Portanto, os valores de dissolução foram calculados considerando a solução de estigmasterol como liberação completa (100%).

TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE DE DISSOLUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

TEMPO DE DISSOLUÇÃO (min)	% DISSOLUÇÃO (VALORES MÉDIOS)				
	ESTIGMASTEROL	MICROPARTÍCULAS DE GELATINA	CONTROLE NEGATIVO GELATINA	MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO	CONTROLE NEGATIVO ÁCIDO ESTEÁRICO
0	100	0,00	0,00	26,50	0,00
1	100	0,00	0,00	40,42	0,00
5	100	0,00	0,00	75,18	0,00
10	100	0,00	0,00	69,06	0,00
15	100	93,87	0,00	82,95	0,00
30	100	2,77	0,00	49,91	0,00
60	100	3,63	0,00	62,75	0,00
90	100	35,45	0,00	50,07	0,00
120	100	35,45	0,00	32,52	0,00
121*	100	35,45	0,00	98,28	0,00
125	100	35,45	0,00	86,82	0,00
130	100	35,45	0,00	86,82	0,00
135	100	35,45	0,00	86,82	0,00
140	100	35,45	0,00	86,82	0,00
150	100	35,45	0,00	86,82	0,00
160	100	35,45	0,00	86,82	0,00
170	100	35,45	0,00	86,82	0,00
180	100	35,45	0,00	86,82	0,00
210	100	35,45	0,00	86,82	0,00
240	100	35,45	0,00	86,82	0,00
270	100	35,45	0,00	86,82	0,00
300	100	35,45	0,00	86,82	0,00
330	100	35,45	0,00	86,82	0,00
360	100	35,45	0,00	86,82	0,00

*: momento da mudança de meio ácido pH 1,2 para meio tamponado pH 7,4

GRÁFICO 4 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO DO ESTIGMASTEROL E MICROPARTÍCULAS



Os perfis de dissolução demonstram que o fármaco é liberado de ambas as amostras de micropartículas em meio ácido, embora o revestimento de ácido esteárico libere o seu conteúdo completamente quando ocorre a mudança de pH do meio. Pode-se sugerir que as preparações permitem a absorção do fármaco em meio estomacal, tendo em vista a estrutura esteroideal pouco ionizável (portanto a absorção do fármaco é relativamente independente do pH, contudo eventuais íons são presentes em meio alcalino, reduzindo a absorção nesta condição) e os resultados de coeficiente de partição óleo-água altos (indicando alta afinidade por meios lipossolúveis, como a membrana das células da parede do trato gastrointestinal).

As micropartículas revestidas com gelatina liberam todo o fármaco em meio que simula o modelo estomacal, sendo que aos 60 minutos é praticamente esgotado completamente e aos 15 minutos a liberação é máxima, assumindo um perfil de liberação aparentemente imediata e demonstrando que a erosão da matriz polimérica do revestimento da microcápsula expõe rapidamente o conteúdo do núcleo lipídico. No entanto, o revestimento de ácido esteárico promove a liberação

completa e rápida após a mudança do pH, assumindo um perfil de liberação aparentemente modificada porém não controlada. A realização de esforços que alterem a composição deste revestimento podem resultar em vetores com liberação modificada, controlada ou gastro-resistentes. O perfil de liberação observado para as microesferas com revestimento lipídico reflete a provável erosão de uma matriz única na qual distribui-se o fármaco, ou mesmo difusão do mesmo pelo material de revestimento, mais lenta que a degradação da gelatina em meio ácido. O contato com o meio alcalino, porém, promove desestruturação da micropartícula provavelmente por envolvimento de variabilidade de carga elétrica e alteração de interações intermoleculares a partir da formação de ânions estearato.

Os dados calculados para o estudo da cinética de liberação das amostras encontram-se na tabela 13, e confirmam a propriedade de pronta liberação do fármaco das micropartículas revestidas por gelatina, assumindo cinética de primeira ordem com constante de velocidade 3,07; enquanto as micropartículas de ácido esteárico apresentam liberação modificada (porém não controlada) com cinética de pseudo zero ordem (Higuchi), ou seja, liberação não imediata, cujo fármaco não vem a ser liberado na mesma quantidade por unidade de tempo. A constante de velocidade de liberação é de 0,82, sendo que em cerca de 24 minutos o fármaco é liberado em 50%.

TABELA 13 – RESULTADOS CALCULADOS DE ESTUDO DE CINÉTICA, ED E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ESTIGMASTEROL

AMOSTRA	Estigmasterol		Micropartículas gelatina			Micropartículas ácido esteárico		
ED (%)	100,00		31,15			76,28		
T STUDENT*	Micropart Protéico	Micropart Lipídico	Estigmast	Micropart Lipídico	Controle negativo	Estigmast	Micropart. Protéico	Controle negativo
	-24,741	-21,1774	-24,741	12,79095	-24,741	-21,1774	12,79095	-21,1774
TIPO LIBERAÇÃO	-		Pronta liberação (Cinética Primeira Ordem)			Liberação Modificada (Cinética Pseudo Zero Ordem)		
CONSTANTE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO (K)	-		3,074			0,827		
T50% (min)	-		0,22			24,24		

* t crítico: 4,303

A comparação dos perfis de dissolução por meio da avaliação da curva obtida foi realizada por meio do valor de eficiência de dissolução (ED), calculado a partir dos valores de área sob a curva e a área total do gráfico de perfil de dissolução (gráfico 4). Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 13. A análise estatística dos resultados de ED(%) mostra que todas as amostras são significativamente diferentes entre si, visto que todos os valores de t são maiores do que o t crítico (4,303) para o grau de liberdade (GL=2) e nível de risco ($\alpha=0,05$) previamente determinados (CONTI, 2006). Segundo TROCHIM (2006), os valores negativos de t ocorrem porque as amostras teste apresentam valores de ED menores do que o da amostra referência, e que para a análise deve-se considerar o valor numérico.

A quantificação da comparação dos perfis de dissolução por meio do cálculo de f1 e f2 resultaram nos dados da tabela 14.

TABELA 14 – CÁLCULO DE FATOR DE DIFERENÇA (f1) E FATOR DE SIMILARIDADE (f2) ENTRE OS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

AMOSTRAS	f1			f2		
	Estigmasterol	Micropartículas gelatina	Micropartículas ácido esteárico	Estigmasterol	Micropartículas gelatina	Micropartículas ácido esteárico
Estigmasterol	-	70,71	24,87	-	-36,48	-13,80
Micropartículas gelatina	70,71	-	61,02	-36,48	-	-27,07
Micropartículas ácido esteárico	24,87	61,02	-	-13,80	-27,07	-

Tendo em vista os critérios para que dois perfis sejam considerados semelhantes (f1 com valor entre 0 e 15, e f2 entre 50 e 100), pode-se afirmar que o microencapsulamento promove uma grande alteração na dissolução do estigmasterol, sendo que o revestimento protéico promove a diferenciação mais significativa. Por outro lado, os dois tipos de revestimento também diferenciam-se entre si de maneira notável.

4.3.3.3 Ensaio de permeação cutânea

O ensaio de permeação cutânea por método de *tape stripping* foi realizado utilizando-se sete fitas adesivas seqüencialmente aplicadas e retiradas, capturando assim o material contido em uma profundidade gradualmente maior do estrato córneo epidérmico.

Este material, após tratamento e doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência por método previamente descrito (3.5.2), apresentou como resultados os dados contidos na tabela 15 e gráfico 5. Pode-se notar a permeação apenas do controle positivo (grau de profundidade atingido pela segunda fita adesiva, com a concentração de 0,05mg/mL) e das micropartículas revestidas com ácido esteárico (grau de profundidade atingido pela segunda fita adesiva, com a concentração de 0,06mg/mL).

GRÁFICO 5 – PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO ESTIGMASTEROL CONTIDO NAS AMOSTRAS

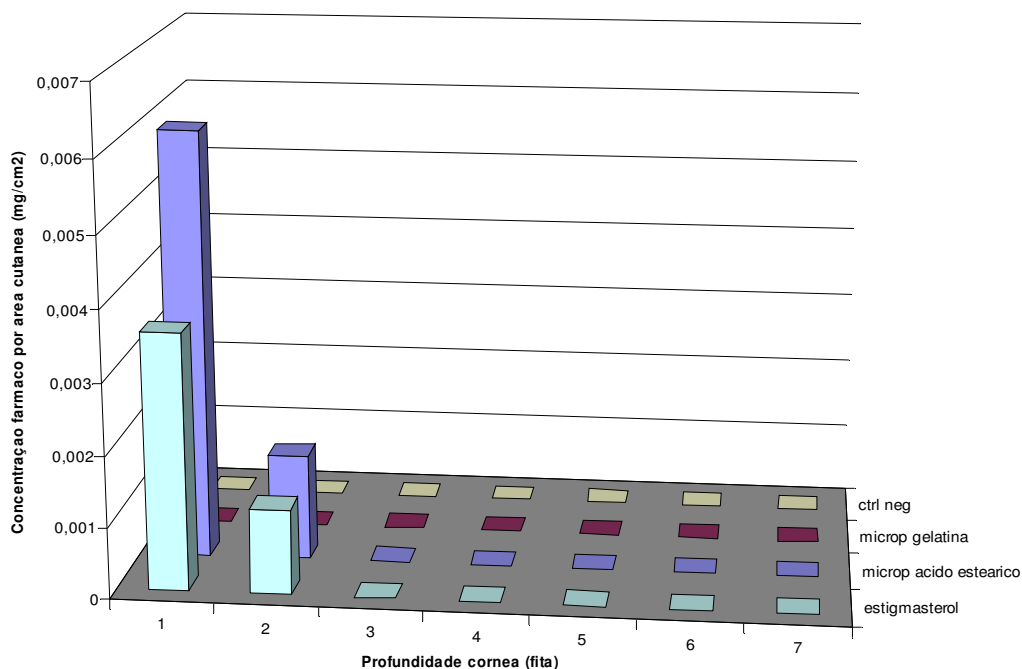


TABELA 15 – DADOS OBTIDOS PELO ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA

AMOSTRA	FITA ADESIVA (ESTRATO CUTÂNEO)	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	CONCENTRAÇÃO (mg/cm ²)
ESTIGMASTEROL	1	0,014 ($\pm 0,0036$)	0,0036
	2	0,005 ($\pm 0,0030$)	0,0012
	3	0,000 ($\pm 5,77 \times 10^{-5}$)	0,0000
	4	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	5	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	6	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	7	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
MICROPARTÍCULAS REVESTIDAS COM ÁCIDO ESTEÁRICO	1	0,024 ($\pm 0,0046$)	0,0060
	2	0,006 ($\pm 0,0015$)	0,0015
	3	0,000 ($\pm 0,0001$)	0,0000
	4	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	5	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	6	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	7	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
CONTROLE NEGATIVO ÁCIDO ESTEÁRICO	1	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	2	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	3	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	4	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	5	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	6	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	7	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
MICROPARTÍCULAS REVESTIDAS COM GELATINA	1	0,000 ($\pm 5,77 \times 10^{-6}$)	0,0000
	2	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	3	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	4	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	5	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	6	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	7	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
CONTROLE NEGATIVO GELATINA	1	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	2	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	3	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	4	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	5	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	6	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000
	7	0,000 ($\pm 0,0000$)	0,0000

Pode-se verificar alguma permeação pelo *stratum corneum* por parte do estigmasterol em solução hidroetanólica, no entanto as micropartículas com revestimento de ácido esteárico promovem uma permeação um pouco maior. O estigmasterol contido nas micropartículas de gelatina, por sua vez, não apresenta nenhuma permeabilidade frente ao tecido cutâneo intacto.

Tais resultados estão de acordo com o esperado, tendo em vista que a classificação biofarmacêutica (4.3.3.1) do estigmasterol aponta algum grau de permeabilidade por membranas celulares, contudo o revestimento lipídico promoveria um aumento na sua capacidade permeante, principalmente por ser constituído por um ácido graxo amplamente presente na pele. No entanto, verifica-se que o modelo teórico representado pela verificação da determinação do coeficiente de partição o/a não sempre é confirmado pelos dados práticos, visto que o valor de $\log P = 6,16$ obtido para o estigmasterol indica a não aptidão do mesmo para a permeabilidade cutânea. Destaca-se então a importância da prática experimental na verificação das propriedades dos fármacos e preparações farmacêuticas.

O revestimento protéico seria mais conveniente por via oral, tendo em vista a baixa interação com a barreira que o *stratum corneum* representa para a epiderme, a qual tem natureza predominantemente lipídica devido à composição de queratina e lipídeos cutâneos (MOSS *et al.*, 2002). Portanto, ampla interação da mesma ocorre com materiais com natureza hidrofóbica, que apresentariam maior penetrabilidade frente à pele e mucosas – no entanto a absorção a nível sistêmico é limitada. Contudo, supõe-se que uma vez ultrapassada a barreira córnea, as micropartículas com revestimento de gelatina apresentariam penetração mais profunda que aquelas revestidas com ácido esteárico, por serem menores em tamanho e de natureza protéica, interagindo com maior facilidade com a matriz intracelular dos tecidos.

4.3.4 Avaliação da Estabilidade do Estigmasterol Microencapsulado

Os resultados estudo de degradação térmica do padrão de stigmasterol estão representados na tabela 16. Verifica-se a formação de produtos de degradação a partir de 60 minutos sob aquecimento a 150°C, sendo que ao fim de 200 minutos o número de compostos formados é seis, em concentrações variáveis.

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS POR ESTUDO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

AMOSTRA	TEMPO DE AQUECIMENTO	OBSERVAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE	DETECÇÃO EM RAZÃO DO PICO DO FÁRMACO					
				COMPOSTO A	COMPOSTO B	COMPOSTO C	COMPOSTO D	COMPOSTO E	COMPOSTO F
0	0	Não submetida a aquecimento	0,36 (\pm 0,06)	-	-	-	-	-	-
1	15	—	0,33 (\pm 0,12)	-	-	-	-	-	-
2	30	—	0,43 (\pm 0,07)	-	-	-	-	-	-
3	60	Sinais de degradação	0,12 (\pm 0,09)	0,08	0,14	0,16	0,06	-	-
4	75	Sinais de degradação	0,45 (\pm 0,11)	0,01	0,02	0,01	0,03	-	-
5	105	Sinais de degradação	0,53 (\pm 0,20)	0,05	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
6	140	Sinais de degradação	0,30 (\pm 0,06)	0,06	0,16	0,05	0,06	0,04	0,03
7	160	Sinais de degradação	0,43 (\pm 0,18)	0,08	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03
8	180	Sinais de degradação	0,31 (\pm 0,13)	0,18	0,09	0,08	0,07	0,08	0,06
9	200	Sinais de degradação	0,18 (\pm 0,15)	0,45	0,28	0,23	0,18	0,16	0,18
10	220	Sinais de degradação	0,03 (\pm 0,02)	1,82	1,48	1,24	0,86	0,27	1,14

Os valores de concentração do stigmasterol durante a degradação, apesar de mostrarem-se variáveis devido a baixa precisão analítica para o procedimento de pesagem de quantidades ínfimas de stigmasterol – refletindo a variação nos valores de razões de detecção dos compostos de degradação, demonstram a tendência à redução, enquanto os produtos de degradação apresentam tendência ao aumento de concentração. Tal fato pode ser mais bem elucidado observando-se os gráficos 6 e 7.

GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO DE ESTIGMASTEROL DURANTE O ENSAIO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

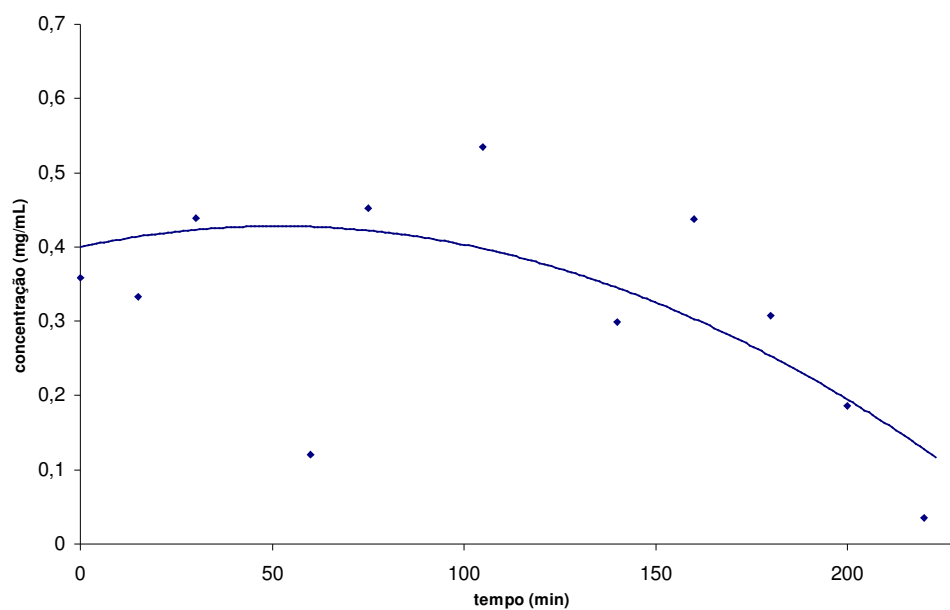
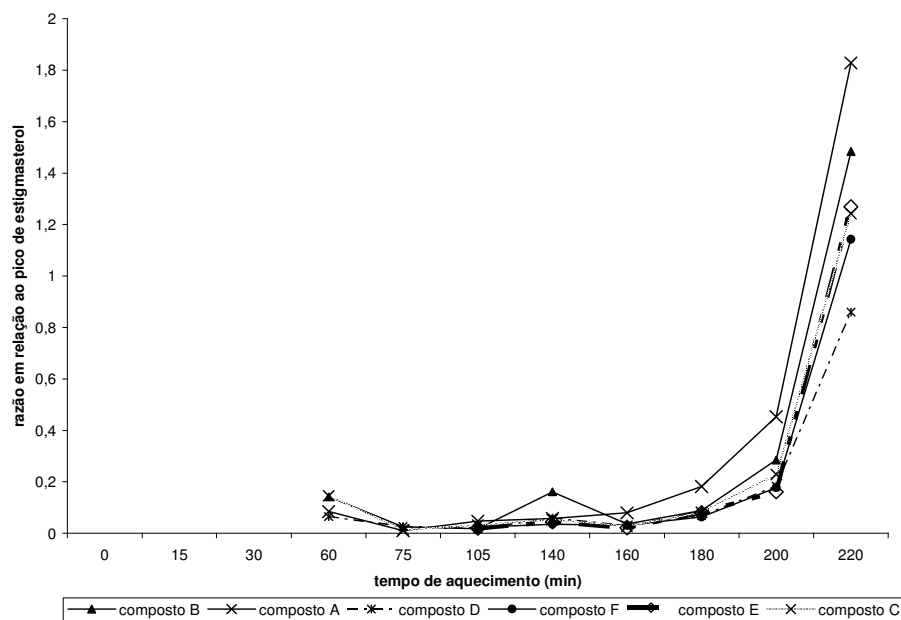


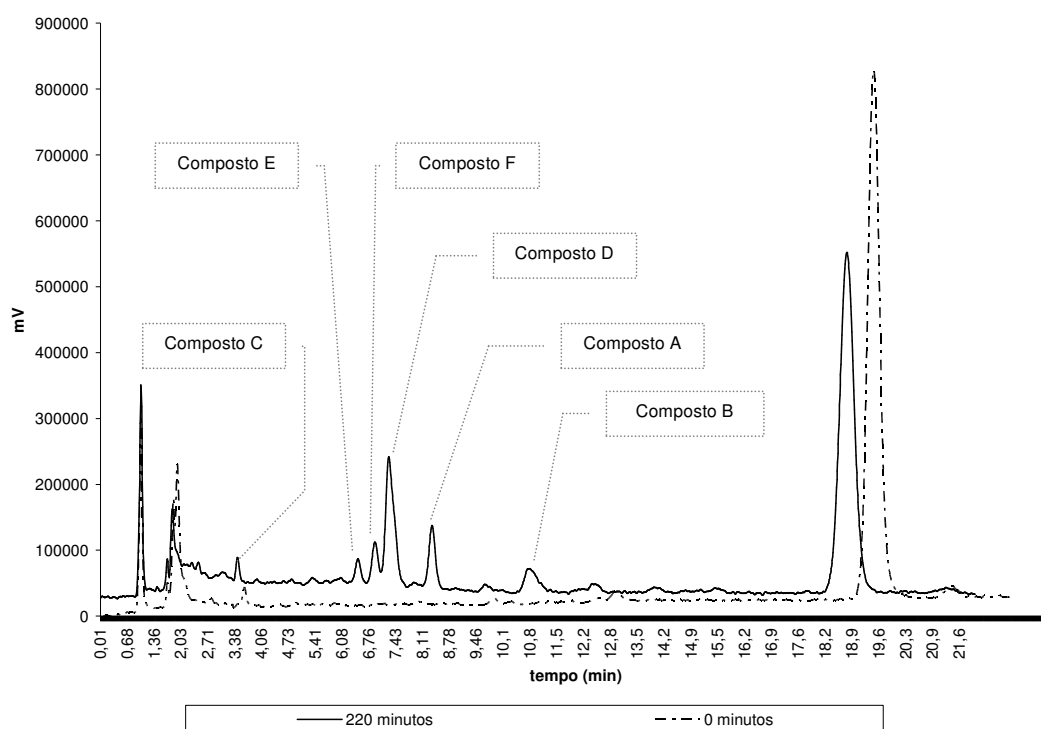
GRÁFICO 7 – PERFIL DE FORMAÇÃO DE COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ESTIGMASTEROL



A quantificação dos produtos de degradação foi relativa, pois na ausência destes compostos purificados que pudessem servir de padrão analítico, utilizou-se como estratégia o cálculo da relação da área dos picos cromatográficos dos mesmos com aquela do pico de estigmasterol, obtendo-se um valor adimensional para fins de comparação.

Pode-se notar que os compostos de degradação são observados a partir de uma hora de exposição do estigmasterol à temperatura de 150°C. Os resultados condizem com aqueles encontrados em literatura, pois LAMPI e colaboradores (2002) encontraram seis produtos de degradação formados por termo-oxidação do estigmasterol, e os descreve como 7 α -hidroxi-estigmasterol, 7 β -hidroxi-estigmasterol, 25-hidroxi-estigmasterol, 5 α ,6 α -epoxiestigmasterol, 5 β ,6 β -epoxiestigmasterol, 7-ceto-estigmasterol.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE DURANTE O ENSAIO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO ESTIGMASTEROL



Com base nos resultados observados nos cromatogramas (figura 20), pode-se sugerir que os compostos A, B, C, D, E, e F correspondem, respectivamente, a 7 β -hidroxi-estigmasterol, 7 α -hidroxi-estigmasterol, 7-ceto-estigmasterol, 5 α ,6 α -epoxiestigmasterol, 25-hidroxi-estigmasterol, e 5 β ,6 β -epoxiestigmasterol, de acordo com a polaridade das substâncias e o seu tempo de eluição, visto que compostos com maior polaridade apresentam menor tempo de eluição com a fase móvel utilizada.

Esta definição baseou-se na premissa de que substituintes β (equatoriais ao plano do anel cicloperidropentanofenantrênico) são mais polares do que os substituintes α (axiais ao anel) (STAHL, 1969); e confirmou-se a partir dos dados reportados por LAMPI e colaboradores (2002) durante a separação dos produtos de degradação de fitoesteróides, cujos tempos de retenção se mostram semelhantes aos resultados observados nos cromatogramas obtidos (figura 20).

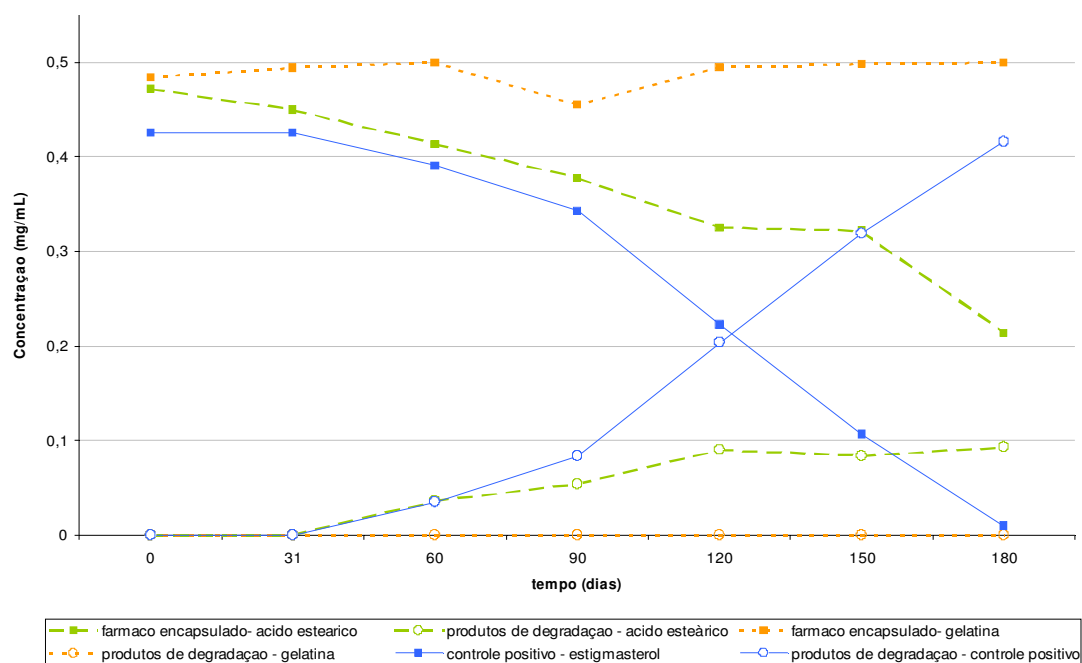
Uma vez verificada a possibilidade de detecção e quantificação relativa dos compostos de degradação do estigmasterol, o ensaio de estabilidade acelerada das micropartículas foi realizado de acordo com o procedimento preconizado pela normatização RE 01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005) e já descrita anteriormente (3.5.5).

Os resultados desta prática encontram-se dispostos na tabela 17 e gráfico 8. Verifica-se a formação dos compostos de degradação A, C e D a partir de 60 dias no controle positivo (solução hidroetanólica de estigmasterol), sendo que ocorre a formação também do composto B aos 180 dias de ensaio. Para as micropartículas revestidas com ácido esteárico, o início da formação dos compostos de degradação A, C, D a partir de estigmasterol ocorreu também a partir dos 60 dias, porém não ocorreu a formação do composto B. As micropartículas revestidas com gelatina, no entanto, não permitiram a formação de produtos de degradação. O gráfico 8 demonstra que à medida que os níveis de estigmasterol diminuem, a concentração de produtos de degradação aumenta, para o controle positivo e também para as micropartículas revestidas com ácido esteárico.

TABELA 17 – RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS AMOSTRAS SEGUNDO LEGISLAÇÃO VIGENTE

TEMPO (DIAS)	ESTIGMASTEROL			MICROPARTÍCULAS GELATINA			MICROPARTÍCULAS ÁCIDO ESTEÁRICO		
	CONC FÁRMACO (mg/mL)	CONC FÁRMACO CONVERTIDO EM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO (mg/mL)	PRODUTO DE DEGRADAÇÃO FORMADO	CONC FÁRMACO ENCAPSULADO (mg/mL)	CONC FÁRMACO CONVERTIDO EM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO (mg/mL)	PRODUTO DE DEGRADAÇÃO FORMADO	CONC FÁRMACO ENCAPSULADO (mg/mL)	CONC FÁRMACO CONVERTIDO EM PRODUTO DE DEGRADAÇÃO (mg/mL)	PRODUTO DE DEGRADAÇÃO FORMADO
0	0,4261 (± 0,0248)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,4845 (± 0,0094)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,4718 (± 0,0389)	0,0000 (± 0,0000)	-
30	0,4261 (± 0,0307)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,4945 (± 0,0315)	0,0000 (± 0,0001)	-	0,4502 (± 0,0582)	0,0000 (± 0,0001)	-
60	0,3908 (± 0,0117)	0,0353 (± 0,0174)	Compostos A, C, D	0,5000 (± 0,0205)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,4141 (± 0,0156)	0,0361 (± 0,0162)	Compostos A, C, D
90	0,3425 (± 0,0360)	0,0836 (± 0,0186)	Compostos A, C, D	0,4554 (± 0,0156)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,3779 (± 0,0350)	0,0542 (± 0,0185)	Compostos A, C, D
120	0,2225 (± 0,0251)	0,2036 (± 0,0515)	Compostos A, C, D	0,4948 (± 0,0551)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,3258 (± 0,0168)	0,0900 (± 0,0310)	Compostos A, C, D
150	0,1068 (± 0,0308)	0,3193 (± 0,0314)	Compostos A, C, D	0,4981 (± 0,0311)	0,0000 (± 0,0000)	-	0,3222 (± 0,0239)	0,0838 (± 0,0092)	Compostos A, C, D
180	0,0100 (± 0,0044)	0,4161 (± 0,0314)	Compostos A, B, C, D	0,4996 (± 0,0293)	0,0000 (± 0,0001)	-	0,2139 (± 0,0368)	0,0928 (± 0,0110)	Compostos A, C, D

GRÁFICO 8 – RESULTADOS OBTIDOS DURANTE O ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS



As micropartículas consistem em um envoltório ao fármaco esteroidal, que possibilita a sua estabilidade em ambiente externo, devido à barreira mecânica e química contra agentes desestabilizadores que formam. Porém observa-se que sob as condições de estresse às quais as amostras são submetidas durante o ensaio, ocorre um aumento da liberação do fármaco do interior das micropartículas com revestimento de ácido esteárico, expondo-o à ação oxidativa e promovendo a formação de produtos de degradação. Contudo, o efeito degradativo é sempre menor do que aquele observado para o estigmasterol em solução hidroetanólica (controle positivo). As micropartículas de gelatina, no entanto, durante o período do ensaio realizado, demonstraram fornecer maior estabilidade ao estigmasterol apesar de apresentar dimensões menores (ou seja, maior área de superfície a ser atingida por fatores desestabilizadores do ambiente), provavelmente porque o envoltório protéico é mais resistente por ser menos reativo com tais fatores, impedindo portanto a liberação do fármaco do seu interior, expondo-o à degradação.

TABELA 18 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

TEMPO (DIAS)	VALOR DE T (STUDENT)					
	CONCENTRAÇÃO FÁRMACO ENCAPSULADO			CONCENTRAÇÃO FÁRMACO DEGRADADO		
	CONTROLE POSITIVO X MICROPARTÍCULAS GELATINA	CONTROLE POSITIVO X MICROPARTÍCULAS ÁCIDO ESTEÁRICO	MICROPARTÍCULAS ÁCIDO ESTEÁRICO X GELATINA	CONTROLE POSITIVO X MICROPARTÍCULAS GELATINA	CONTROLE POSITIVO X MICROPARTÍCULAS ÁCIDO ESTEÁRICO	MICROPARTÍCULAS ÁCIDO ESTEÁRICO X GELATINA
0	3,809422	1,715555	-0,54878	0	0	0
30	2,694369	0,635216	-1,15842	0,994377	0,994377	0
60	7,99273	2,065323	-5,77589	-3,50817	0,064061	3,861987
90	4,980516	1,220305	-3,50063	-7,76715	-1,93744	5,061696
120	7,795776	5,930875	-5,08469	-6,84804	-3,27411	5,038465
150	15,48857	9,576701	-7,77526	-17,6363	-12,4806	15,73503
180	28,59663	9,523637	-10,5169	-22,9539	-16,8262	14,58224

* t crítico: 4,303

Tais dados foram submetidos à análise estatística (teste t de *student*) demonstrada na tabela 18, que confirma os resultados obtidos como diferentes entre si pelo menos após 120 dias: os valores de t calculados entre as amostras separadas em pares são maiores do que t crítico (4,303) para o grau de liberdade

(GL=2) e nível de risco ($\alpha=0,05$) previamente selecionados (CONTI, 2006; TROCHIM, 2006).

Especificamente, pode-se observar que os valores de concentração de fármaco revestido com ácido esteárico são estatisticamente iguais aos valores de concentração de fármaco em solução do controle positivo até 90 dias, no entanto, a concentração de fármaco convertido em produtos de degradação é semelhante até 120 dias. O perfil das micropartículas revestidas com gelatina, por sua vez, diferencia-se do controle positivo quanto à concentração de fármaco encapsulado já aos 60 dias, e quanto à formação de produtos de degradação aos 90 dias. No entanto, os dois tipos de revestimento diferenciam-se entre si já a partir de 60 dias quanto à concentração de fármaco encapsulado e de 90 dias quanto à formação de produtos de degradação do estigmasterol.

Portanto, a degradação do estigmasterol externo às micropartículas ocorre até 60 dias, e a partir de então a fonte de produtos de degradação do estigmasterol é o fármaco liberado do interior das micropartículas. Tendo em vista que o revestimento protéico conteve o fármaco envolvido por todo o período do ensaio, a diferença estatística de concentrações de estigmasterol encapsulado e de fármaco convertido em produtos de degradação, entre as micropartículas revestidas com gelatina e aquelas revestidas com ácido esteárico, assim como o controle positivo, aumenta proporcionalmente ao tempo.

Contudo, o revestimento lipídico conteve parcialmente a degradação do estigmasterol por meio da liberação não total do fármaco, mantendo-o relativamente protegido a partir de 120 dias de ensaio, e a partir de então diferente estatisticamente do controle positivo no que diz respeito à formação de produtos de degradação. Os compostos formados (tabela 17) indicam que a degradação do estigmasterol proveniente da amostra microencapsulada com ácido esteárico é mais lenta que aquela do estigmasterol livre.

5 CONCLUSÃO

Após estudos bibliográficos, realização e análise dos resultados do presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

O estigmasterol, substância amplamente presente em espécies vegetais em baixas concentrações, apresenta um grande potencial farmacológico quanto à utilização como hipocolesterolêmico, antinociceptivo e preventivo de câncer mamário e prostático. Contudo, a dose terapêutica é de difícil acesso devido à baixa absorvidade do esteróide pelo organismo e à facilidade de oxidação do mesmo quando exposto ao ambiente.

A extração do estigmasterol com rendimento satisfatório (0,05%) a partir de fonte vegetal de fácil obtenção e baixo custo foi realizada utilizando como matéria-prima 10,43 kg de cascas de frutos de *Musa paradisiaca* L., Musaceae, por meio de partição sólido-líquido com sílica gel G em aparelho de soxhlet modificado utilizando seqüência de solventes com aumento gradual de polaridade, seguido de purificação por dupla recristalização. A semelhança físico-química entre os esteróides permite sugerir que o modelo proposto para a extração do estigmasterol estende-se para a referida classe de substâncias.

O microencapsulamento do estigmasterol foi realizado visando a observação de aumento de absorvidade e redução da degradação do mesmo. Para tanto, foram investigados os instrumentos, materiais a serem utilizados e metodologias de microencapsulamento relativamente simples, levando-se em consideração a disponibilidade de infra-estrutura e a natureza lipofílica do fármaco, além da eficácia de encapsulamento teórica, para a viabilização da sua prática. Portanto, sob a ótica de naturezas diferenciadas dos componentes de revestimento, elegeu-se a gelatina como componente polimérico protéico enquanto o ácido esteárico constituiu o componente lipídico. Da mesma forma e pelo mesmo motivo sugerido para o modelo de extração do fármaco em questão, o microencapsulamento de outras substâncias esteroidais deve seguir o mesmo perfil de resultados obtidos com o estigmasterol.

A análise comparativa das características físicas e químicas dos diferentes tipos de micropartículas produzidas favorece o revestimento protéico pela maior homogeneidade de tamanho e forma, além de serem diminutas como dimensão e apresentarem maior eficácia de encapsulamento.

Levando-se em conta as vantagens conferidas ao fármaco encapsulado, a análise absorptiva favorece o revestimento lipídico, uma vez que este demonstrou conferir um aumento da absorção do fármaco por via percutânea no ensaio *in vitro* realizado; enquanto os testes de triagem indicam um favorecimento desta preparação também por via oral, promovendo absorção estomacal com liberação modificada do fármaco, porém não controlada, que se completa em meio básico simulador daquele intestinal.

A verificação da estabilidade conferida ao fármaco pelos diferentes tipos de micropartículas estudados, por sua vez, favorece o revestimento protéico, uma vez que a formação de produtos de degradação sob condições de estresse durante o período de seis meses demonstrou-se ausente para micropartículas com revestimento de gelatina, remetendo à maior resistência das proteínas em relação aos lipídeos a agentes químicos e físicos denominados desestabilizadores; conferindo desta forma proteção mecânica e química ao fármaco encapsulado.

Enfim, para a utilização do estigmasterol com a finalidade hipocolesterolêmica, a propriedade de estabilidade é a mais conveniente, pois o mecanismo de ação envolvido mais provável é o impedimento de absorção intestinal de colesterol, por meio de uma ação local. Neste caso, as micropartículas com revestimento protéico são as indicadas dentre as estudadas. Contudo, para a utilização do esteróide como preventivo de câncer ou como antinociceptivo, a sua absorção é conveniente para a atuação no sítio de ação; favorecendo assim a utilização de micropartículas com revestimento lipídico com a possibilidade de administração também por via percutânea. No entanto, são necessários maiores estudos procurando alterar a composição deste revestimento oferecendo as propriedades de permeação mais aprofundada da epiderme, trânsito sistêmico, ou até mesmo de reconhecimento do sítio de ação do fármaco permitindo sua biodisponibilidade de maneira específica.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 7 ed. New York : Lippincott Williams & Wilkins. p. 229-243. 1999.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 10 de 2001**. Brasília : Diário Oficial da União de 09 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 14ago.2005.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n.º 310 de 2004**. Brasília : Diário Oficial da União de 29 de maio de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 26set.2006.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE n.º 1 de 2005**. Brasília : Diário Oficial da União de 01 de agosto de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Consulta em: 10dez.2005.

ARIAS, P.; DANKERS, C.; LIU, P.; PILKAUSKAS, P. The world banana economy 1985-2002. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome; 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm>> Acesso em: 23 jul.2006.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre : Artmed Editora, p. 17-38, 223-284. 2005.

AWAD, A. B.; FINK, C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, 130, p. 2127-2130. 2000.

BARRY, B. W. **Dermatological Formulation - Percutaneous Absorption**. New York : Marcel Dekker, Inc., p. 234-295. 1983.

BERGSTROM, S.; WINTERSTEINER, O. Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution – VI. The influence of esterification and of constitutional factors. **Journal of Biological Chemistry**, 145 (1), p. 327-333. 1942.

CAVALLI, R; PEIRA, E.; CAPUTO, O.; GASCO, M. R. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics** 182, p. 59-69. 1999.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of Chromatography A**, 935, p. 249-257. 2001.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado

em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências Químico-Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí : Univali Editora. p. 24-31, 169-171, 179-210, 220-226. 2003.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2 ed. New York : Marcel Dekker, Inc., p. 301-375. 1991.

CONTI, F. **Biometria – Bioestatística, Distribuição de t (Student)**. Belém - PA. 2006. Disponível em: <<http://www2.ufpa.br/dicas/biome/biotat.htm>> Acesso em: 10dec.2006.

CORTESI, R.; NASTRUZZI, C.; DAVIS, S. S. Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. **Biomaterials**, 19, p. 1641-1649. 1998.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13, p. 123-133. 2001.

COX, D. C.; DOUGLAS, C. C.; FURMAN, W. B.; KIRCHHOEFER, R. S.; MYRICK, J. W.; WELLS, C. E. Guidelines for dissolution testing. **Pharmaceutical Technology International**, 2 (1), p. 37-49. 1979.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4 ed. São Paulo : Editora Edgard Blücher Ltda. p. 968. 1998.

DUARTE, M. R. **Morfologia de Fármacos Vegetais**. Curitiba : Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, 2001. p. 61-70.

DUKE, J. **Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases**. Disponível em: <<http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=STIGMASTEROL>> Acesso em: 06 jan.2006.

DUCHÊNE, D; WOUESSIDJEWE, D; GILLES, P. Cyclodextrins and Carrier Systems. **Journal of Controlled Release** 62, p. 263-268.1999.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo : Atheneu, 1988.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**. Rockville : Center Drug Evaluation and Research (CDER), BP 1. 1997.

FERGUSON, N. M. **A Textbook of Pharmacognosy**. New York : The Macmillan Company. p. 332. 1956.

FERRAZ, H. G.; CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 34(2), p. 93-99. 1998.

FIESER, L. F.; FIESER, M. **Steroids**. New York : Reinhold Publishing Corporation. p. 341-363. 1959.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, 33, p. 15-27. 2003.

FRANCO, G. **Nutrição**. 6 ed. Atheneu : Rio de Janeiro. p.138. 1982.

GASPAR, R. Vectorização de Medicamentos com Nanopartículas de Polialquilcianoacrilato (PACA). **Revista Portuguesa de Farmácia** XLI (3). 1991.

GASPAROTTO, F. S. **Fatores relacionados à síntese de matérias-primas que podem alterar a biodisponibilidade do medicamento genérico**. Porto Alegre, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GNU – FREE DOCUMENTATION LICENSE. **Bananier**. Wikipedia – L’encyclopédie libre. Disponível em: <<http://fr.wikipedia.org/wiki/Bananier>> Acesso em 28 jul.2006.

GOEL, K.; GOVINDA, D.; SANYAL, K. In vivo antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* L root extracts. **Fitoterapia**, 60(2), p.157-158. 1989.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.; DRAGO, V. Liberação de ferro (III) de microesferas reticuladas de quitosana. **Visão Acadêmica**, 6 (1), p. 15-24; 2005. Disponível em: <<http://www.visaoacademica.ufpr.br/v6n1/lferro.htm>> Acesso em: 12 nov.2005.

GOODMAN-GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. MacGraw Hill Interamericana Editores S.A. : Rio de Janeiro. p. 903-943, 1045-1065. 1996.

GRIEVE, M. **Plaintain Fruit**. A Modern Herbal. Disponível em: <<http://botanical.com/botanical/mgmh/p/plafru51.html>> Acesso em 30 jul.2006.

GUEDAS, V. M. G. **Tecnología Farmacéutica – Texto para el ingeniero farmacéutico**. Zaragoza : Editorial Acribia. p. 61-65. 1981.

GUEVARA, I. O.; RODRIGUEZ, C. C. T.; PERES, M. R. C.; FERNANDES, O. S. L.; RODRIGUEZ, S. S.; ALVAREZ, D.; CASTANEDA, J.; VEGA, J. L. Oral acute toxicity assay of a phytomedicine elaborated with an extract of *Musa paradisiaca* pseudo-stem. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 22(1), p. 57-59. 2003.

GUIDE DES ALIMENTS. **Banane**. Le guide des aliments, histoire, origine, description et valeur calorique, vitamines et minéraux. Disponível em:

<http://www.guide-des-aliments.com/fiche_nutrition_banane_32.html> Acesso em 28 jul.2006.

HALLING, K. K., SLOTTE, J. P. Membrane properties of plant sterols in phospholipids bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1664, p. 161-171. 2004.

HELLGREN, L. I., SANDELIUS, A. S. The impact of different phytosterols on the molecular dynamics in the hydrophobic/hydrophilic interface phosphatidylcholine-liposomes. **Physiologia Plantarum**, 113, p. 23-32. 2001.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de Cosmetologia**. 3 ed. Rio de Janeiro : Livraria e Editora Revinter Ltda. p. 149-157. 1999.

HUNG, C. Y., YEN, G. C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). **Lebensm Wiss U Technol.**, 34(5), p. 306-311. 2001.

JATO, J.L.V. **Tecnologia farmacéutica: formas farmacéuticas**. Madrid : Editorial Sintesis. p. 577-608. 1997.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50, p. 147-160. 2000.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUB, S.; MANGELSDORF, I. Dermal Absorption. **International Programme on Chemical Safety – Environment Health Criteria. United Nations Environment Programme of World Health Organization**. 137p. 2005.

LAMPI, A. M.; JUNTUNEN, L.; TOIVO, J.; PIIRONEN, V. Determination of thermo-oxidation products of plant sterols. **Journal of Chromatography B**, 777, p. 83-92. 2002.

LE HIR, A. **Noções de Farmácia Galênica**. 6 ed. São Paulo : Organização Andrei Editora Ltda. p. 224-227. 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo : Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. p. 188-191, 502-510. 1995.

LEWIS, D.; FIELD, W.; SHAW, G. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca* L) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosion. **Journal of Ethnopharmacology**, 65(3), p.283-288. 1999.

LIM, J. C.; PARK, J. H.; BUDESINSKY, M.; KASAL, A.; HAN, Y. H.; KOO, B. S.; LEE, S. I.; LEE, D. U. Antimutagenic constituents from the thorns of *Gleditsia sinensis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 53 (5), p. 561-564. 2005.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58, p. 265-278. 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, 25(3), p. 429-438. 2002.

MAGILL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics & Toiletries** (Edição em Português) 3, p. 54-57. 1991.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38(4), p. 137-142. 2002.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy – Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences**. 4 ed. New York : Lippincott Williams & Wilkins. p. 512-551. 1993.

MATOS, J. M. D; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico – prático**. Fortaleza : Edições UFC. p. 223-229.1989.

MATSUMOTO, J.; NAKADA, Y.; SAKURAI, K.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, Y. Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, 185, p. 93-101. 1999.

MATVIENKO, O. A.; LEWIS, M. S.; ARNDT, B.; RAINWATER, J. S.; ALEKEL, D. L. A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 76, p. 57-64. 2002.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Curitiba : Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, 2003. 77 p.

MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, 47(1), 13-39, 1979.

MOSS, G. P.; DEARDEN, J. C.; PATEL, H.; CRONIN, M. T. D. Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. **Toxicology in Vitro**, 16, p. 299-317. 2002.

MOSS, G. P.; CRONIN, M. T. D. Quantitative structure-permeability relationships for percutaneous absorption: re-analysis of steroid data. **International Journal of Pharmaceutics**, 238, p. 105-109. 2002.

MUDGE, K. W.; LUCKOW, M. A.; BRENNAN, E. B. **Musa X paradisiaca** Linnaeus, and **Musa acuminata** Colla. Multipurpose and Fruit Trees Commonly Used in

Agroforestry, version 1.4, College of Agriculture and Life Sciences at Cornell University. 1995. Disponível em: <<http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/hort400/mpts/musa.html>> Acesso em: 28 jul.2006.

MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 45, p. 149-155. 1998.

MÜLLER, R. H.; MÄDEN, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 50, p. 161-177. 2000.

NAIR, P.P.; TURJMAN, N.; KESSIE, G.; CALKINS, B.; GOODMAN, G. T.; DAVIDOVITZ, H.; NIMMAGADDA, G. Diet, nutrition intake, and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 40, p. 927-930. 1984.

NGO, P.; DVORKIN, L.; WHELAN, J. **Musa paradisiaca**. Herbal Index, Boston healing and landscape project. Disponível em: <http://www.bmc.org/pediatrics/special/bhlp/pages/herbs/herb_monographs/musa_paradisiaca.htm> Acesso em: 30 jul.2006.

NORMÉN, A. L.; BRANTS, H. A. M.; VOORRIPS, L. E.; ANDERSSON, H. A.; BRANDT, P. A.; GOLDBOHN, R. A. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 74, p. 141-148. 2001.

NWAFOR, S.; ESIMONE, C. O.; AMADI, C. A.; NWORY, C. S. In vivo interaction between ciprofloxacin hydrochloride and the pulp of unripe plantain (*Musa paradisiaca* L). **European Journal of Drug Metabolism & Pharmacokinetics**, 28(4), p. 253-258. 2003.

OJEWOLE, J.; ADEWUNMI, C. Hypoglycemic effect of methanolic extract of *Musa paradisiaca* L (Musaceae) green fruits in normal and diabetic mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 25(6), p. 453-456. 2003.

OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Extração Fitoquímica de Esteróides por Partição Sólido-Líquido com Sílica-gel G em Aparato de Soxhlet Modificado. **Química Nova**, Submetido. 2007.

ORIE, N. Direct vascular effects of plantain extract in rats. **Experimental Physiology**, 82(3), p. 501-506. 1997.

PIROT, F.; YOGESHVAR, N. K.; STINCHCOMB, A. L.; KEATING, G.; BUNGE, A.; GUY, R. H. Characterization of the permeability barrier of human skin *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94, p. 1562-1567. 1997.

PRIDHAM, J. B. **Terpenoids in Plants**. London : Academic Press. p. 9-12,160-174. 1967.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24 (12), p. 1113-1128. 1998.

REZENDE, J. R.; RODRIGUES, S. B.; JABOR, I. A. S.; PAMPHILE, J. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26(4), p. 481-484. 2004.

RIEGO-SINTES, J. **Partition coefficient**. European Chemicals Bureau. 1992. Disponível em: <<http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Testing-Methods/ANNEXV/A08web1992.pdf>>, acesso em 10ago.2006

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier. p. 62-64, 159. 1997.

ROBINSON, T. **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6 ed. Massachusetts : Cordus Press. p. 151-153. 1991.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P.; LÓPEZ-CERVANTES, J. An HPLC method for quantification of sterols on edible seaweeds. **Biomedical Chromatography**, 18(3), p. 183-190. 2004.

SANTOS, A. R. S.; NIERO, R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; PIZZOLATTI, M. G.; MONACHE, F. D.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, 61, p. 329-332. 1995.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microesferas – Uma Alternativa Viável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 16, p. 26-30. 2000.

SÄYNÄJOKI, S.; SUNDBERG, S.; SOUPAS, L.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Determination of stigmasterol primary oxidation products by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, 80, p. 415-421. 2003.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E. **Skin Barrier – Principles of Percutaneous Absorption**. Basel : Karger, p. 1-42. 1996.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 56, p. 501-505. 2003.

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process

parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 55, p. 125-131. 2003.

SHABIR, G. A. HPLC method development and validation for pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Technology Europe**, 16(3), p. 37-47. 2004.

SILVA, J. P. S; FERREIRA, J. P. M. Microencapsulação: Técnicas e Aplicações. **Revista Portuguesa de Farmácia** 48 (3), p. 97-104. 1998.

SILVOPASCICULTURA, DEPTO. **Clasificación de los cornófitos según Engler (1954-1964)**. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes de La Universidad Politecnica de Madrid. Disponível em: <http://www.montes.upm.es/Dptos/DptoSilvopascicultura/Botanica/Cla_engler.html> Acesso em 15 jun.2005.

SINGH, P.; ROBERTS, M. S. Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 268(1), p. 144-151. 1994.

SOFFNER, M. L. A. P. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira**. Piracicaba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 17 ed. New York : John Wiley & Sons, Inc. p. 937-941, 1156-1157. 1998.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p.1-44. 1998.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**. 2 ed. Berlin : Springer-Verlag. p. 311-357; 855-905. 1969.

TROCHIM, W. M. K. **The t-test**. The Research Methods Knowledge Base. 2006. Disponível em: <http://www.socialresearchmethods.net/kb/stat_t.php> Acesso em 10dec.2006.

ULTREJA, S.; KHOPADE, A. J.; JAIN, N. K. Lipoprotein-mimicking biovectorized systems for methotrexate delivery. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 73, p. 275-279. 1999.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba : Editora da UFPR, 2000. 10 v.

USP – UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 23ed. Rockville : The United States Pharmacopeial Convention, 2391p. 1995.

VAHOUNY, G. V.; CONNOR, W. E.; SUBRAMANIAM, S.; LIN, D. S.; GALLO, L. L. Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, and fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 37, p. 805-809. 1983.

VANDERVOORT, J.; LUDWIG, A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 57, p. 251-261. 2004.

VAN DOKKUM, W. **Bioactive compounds in food**. Explicação Oral. Nutrition and Food Research Institute (Netherlands) e Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnologia Farmacéutica**. 3 ed. Zaragoza : Editorial Acribia. p. 265-268. 1982.

WILLIAMS, D. H.; FLEMING, I. **Spectroscopic Methods in Organic Chemistry**. 5 ed. Berkshire, England : McGraw Hill International, p.39-50, 1995.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R. F.; OTTERBEIN, E. S. **The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 10 ed. Merck & CO. Inc. : Rahway, N. J.; United States of America. p. 1260. 1983.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipids nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, p. 1257-1272. 2004.

XU, W. L.; HUANG, Y. B.; QIAN, J. H.; SHA, O.; WANG, Y. Q. Separation and purification of stigmasterol and β -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. **Separation and Purification Technology**, 41, p. 173-178. 2005.

ZARONI, M. **Polissacarídeos no desenvolvimento de péletes de teofilina de liberação colônica**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná .